

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Martina Vrtalová

STANOVENÍ KYSELINY ACETYLSALICYLOVÉ
TECHNIKOU SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY SE
SPEKTROFOTOMETRICKOU DETEKCÍ

Determination of acetylsalicylic acid by sequential injection
analysis with spectrophotometric detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. srpna 2013.

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. za trpělivé vedení, obětavou pomoc a cenné rady při řešení této práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům, za veškerou pomoc a podporu během studia.

Abstrakt

Tato diplomová práce je věnována stanovení kyseliny acetylsalicylové (ASA) metodou průtokové injekční analýzy (FIA) a sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí. Princip stanovení je založen na rozkladu kyseliny acetylsalicylové (nebo příslušné acetylsalicylové soli) za vzniku salicylanového iontu a jeho následnou interakcí Fe^{3+} iontem v mírně kyselém prostředí, za vzniku chelatačního komplexu $\text{Fe}(\text{SAL})^+$. Pro účely analytického stanovení salicylanu se detekuje nárůst absorbance komplexu v jeho absorpčním maximu. Jako standardní látka byla použita sodná sůl kyseliny acetylsalicylové, salicylan sodný.

Praktickou část lze rozdělit na dva úseky. První část je věnována optimalizaci experimentálních podmínek stanovení, včetně konstrukce průtokové měřicí aparatury a určení základních charakteristik stanovení pomocí FIA techniky. Druhá část práce je věnována optimalizaci experimentálních podmínek stanovení na komerční aparatuře FIA Lab 3500 a zjištěním základních charakteristik stanovení pomocí SIA techniky.

Spolehlivost stanovení kyseliny acetylsalicylové zvolenými technikami byla ověřena analýzou reálných farmaceutických vzorků Acifeinu 250 mg ASA, Anopyrinu 400 mg ASA a Acylpyrinu 500 mg ASA. Získané výsledky analýz všech farmaceutických vzorků dokládají vhodnost této metody pro stanovení kyseliny acetylsalicylové.

Hodnoty základních charakteristik a obsahu analyzované látky ve vzorcích byly vyjádřeny v koncentracích mg L^{-1} ASA. Při FIA uspořádání bylo možné dosáhnout limitu detekce (LOD) $0,540 \text{ mg L}^{-1}$, limitu stanovitelnosti (LOQ) $1,802 \text{ mg L}^{-1}$ a opakovatelnosti (RSD) 0,71 %. Při SIA uspořádání byl zjištěn LOD $0,120 \text{ mg L}^{-1}$, LOQ $1,082 \text{ mg L}^{-1}$ a RSD 0,72 %.

Klíčová slova

Průtoková injekční analýza (FIA), Sekvenční injekční analýza (SIA), kyselina acetylsalicylová, spektrofotometrická detekce, farmaceutické přípravky

Abstract

This diploma thesis is focused on the determination of acetylsalicylic acid using two methods of flow analysis; Flow Injection Analysis (FIA) and Sequential Injection Analysis (SIA) with spectrophotometric detection. The principle of determination is based on the acetylsalicylic acid decomposition to give salicylic ion. This ion reacts subsequently with Fe^{3+} ion in acidic solution leading to colored chelating complex $\text{Fe}(\text{SAL})^+$. The increase of absorbance of this complex in its absorption maximum was used for analytical determination. Sodium salicylate (sodium salt of acetylsalicylic acid) was used as a standard substance.

In the first part of this work, experimental arrangement for flow injection analysis was setup. Continuously the optimization of experimental conditions of acetylsalicylic acid determination was performed to obtain the higher sensitivity. Under the optimal conditions the basic characteristics of determination was measured. In the second part of this work, the commercial experimental instrument FIA Lab 3500 was used for determination. Optimization of experimental conditions and basic characteristic of determination by sequential injection analysis was performed as well.

Developed methods for determination of acetylsalicylic acid with selected technique were verified by analyzing real pharmaceutical samples Acifein 250 mg, Anopyrin 400 mg and Acylpyrin 500 mg. The results of analysis of pharmaceutical samples demonstrate the suitability of this method for the determination of acetylsalicylic acid.

The basic characteristics obtained for both developed techniques and the concentration of analyzed substance in samples were expressed in mg L^{-1} concentration units. For the FIA technique the limit of detection (LOD) 0.540 mg L^{-1} , the limit of quantification (LOQ) 1.802 mg L^{-1} and repeatability (RSD) of 0.71% were achieved. For the SIA technique LOD 0.120 mg L^{-1} , LOQ 1.082 mg L^{-1} and RSD 0.72% were obtained.

Keywords

Flow injection analysis (FIA), Sequential injection analysis (SIA), Acetylsalicylic acid, Spectrophotometric detection, Pharmaceuticals

Obsah

1	CÍL PRÁCE	- 10 -
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	- 11 -
2.1	Průtokové metody	- 11 -
2.1.1	Průtoková injekční analýza	- 12 -
2.1.2	Sekvenční injekční analýza	- 14 -
2.1.3	Lab-on-Valve	- 16 -
2.2	Molekulová absorpční spektrofotometrie	- 17 -
2.2.1	Molekulové orbitály a spektra	- 18 -
2.2.2	Lambert-Beerův zákon	- 19 -
2.3	Kyselina acetylsalicylová	- 20 -
2.3.1	Vznik chelatačních komplexů	- 21 -
2.3.2	Metody stanovení kyseliny acetylsalicylové	- 23 -
2.3.2.1	Lékopisné zkoušky totožnosti	- 23 -
2.3.2.2	Lékopisné stanovení obsahu	- 23 -
2.3.2.3	Další metody stanovení	- 24 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 25 -
3.1	Chemikálie a roztoky	- 25 -
3.2	Přístroje a programy	- 25 -
3.3	Příprava zásobních roztoků	- 26 -
3.4	Rozklad vzorku	- 27 -
3.5	Statické uspořádání měření	- 28 -
3.6	Uspořádání měření FIA	- 28 -
3.6.1	Schéma aparatury FIA	- 29 -
3.6.2	Postup experimentu	- 29 -
3.7	Uspořádání měření SIA	- 30 -
3.7.1	Schéma aparatury SIA-LOV	- 31 -

3.7.2	Postup měření	- 31 -
4	VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE	- 33 -
4.1	Statické uspořádání měření	- 33 -
4.1.1	Absorpční spektrum $\text{Fe}(\text{SAL})^+$ a vybarvovacího činidla	- 33 -
4.1.2	Vliv koncentrace vybarvovacího činidla	- 34 -
4.1.3	Vliv pH na spektrofotometrické stanovení	- 36 -
4.2	Uspořádání měření FIA	- 39 -
4.2.1	Optimalizace objemu dávkovací a reakční smyčky	- 40 -
4.2.2	Optimalizace průtokové rychlosti vody a vybarvovacího činidla	- 41 -
4.2.3	Optimalizace integračního času	- 42 -
4.2.4	Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla	- 42 -
4.2.5	Optimální podmínky FIA	- 43 -
4.2.6	Kalibrační řada FIA	- 44 -
4.2.7	Charakteristiky FIA stanovení	- 46 -
4.2.8	Farmaceutické vzorky FIA	- 47 -
4.3	Uspořádání měření SIA-LOV	- 48 -
4.3.1	Optimalizace rychlosti průtoku detekční celou	- 49 -
4.3.2	Optimalizace pořadí čerpání roztoků	- 50 -
4.3.3	Optimalizace objemu salicylanu sodného a vybarvovacího činidla	- 51 -
4.3.4	Optimalizace času reagentů v reakční smyčce	- 53 -
4.3.5	Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla	- 54 -
4.3.6	Optimální podmínky SIA-LOV	- 55 -
4.3.7	Kalibrační řada SIA-LOV	- 56 -
4.3.8	Charakteristiky SIA-LOV stanovení	- 57 -
4.3.9	Farmaceutické vzorky SIA-LOV	- 58 -
4.4	Porovnání metod FIA a SIA-LOV	- 59 -
5	ZÁVĚR	- 61 -
	SOUPIS BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ	- 62 -

Seznam zkratk a symbolů

A	– absorbance
AAS	– atomová absorpční spektrometrie (Atomic Absorption Spectrometry)
ASA	– kyselina acetylsalicylová
BI	– Bead Injection
B. R. pufr	– Brittonův-Robinsonův univerzální pufr
BW	– Boxcar Width – umožňuje v programu SpectraSuite, od firmy OceanOptic, nastavit „hladkost“ průběhu píku
COX-1	– konsektivní forma enzymu cyklooxygenasy
CFA	– kontinuální průtoková analýza (Continuous Flow Analysis)
DS	– dávkovací smyčka
ε	– molární absorpční koeficient [$\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$]
ΔE_{rot}	– rozdíly energetických rotačních, vibračních a elektronových hladin
ΔE_{vibr}	– rozdíly energetických rotačních, vibračních a elektronových hladin
ΔE_{el}	– rozdíly energetických rotačních, vibračních a elektronových hladin
FIA	– Průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
Φ, Φ_0	– procházející a dopadající světelný tok
IUPAC	– mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
ISE	– iontově selektivní elektroda
λ	– vlnová délka absorpčního maxima [nm]
L, HL	– ligand, ligandová kyselina
LOD	– limit detekce (Limit Of Detection)
LOQ	– limit stanovitelnosti (Limit Of Quantification)
LOV	– průtoková detekční cela je součástí nástavce na vícecestný selekční ventil (Lab-on-Valve)
MO, MO*	– vazebný a antivazebný molekulový orbital
pKa	– disociační konstanta
RS	– reakční smyčka
RSD	– relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
SALNa	– salicylan sodný
SFA	– segmentovaná průtoková analýza (Segmented Flow Analysis)

SIA	– Sekvenční injekční analýza (Sekvential Injection Analysis)
SIC	– Sekvenční injekční chromatografie (Sekvential Injection Chromatography)
SPE	– extrakce na tuhou fázi (Solid Phase Extrction)
T	– transmittance
t_i	– integrační čas [ms]
t_r	– čas reaktantů v reakční smyčce [s]
UV/VIS	– ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření
VČ	– vybarvovací činidlo (roztok $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ v $12 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$)
$v_{(\text{DC})}$	– rychlost průtoku nosného toku detekční celou [$\mu\text{L s}^{-1}$; mL min^{-1}]
$v_{(\text{H}_2\text{O})}$	– rychlost průtoku/aspirace deionizované vody [$\mu\text{L s}^{-1}$; mL min^{-1}]
$v_{(\text{SALNa})}$	– rychlost průtoku/aspirace salicylanu sodného [$\mu\text{L s}^{-1}$; mL min^{-1}]
$v_{(\text{VČ})}$	– rychlost průtoku/aspirace vybarvovacího činidla [$\mu\text{L s}^{-1}$; mL min^{-1}]
ZS	– zadržovací smyčka

1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodu stanovení kyseliny acetylsalicylové vybranými průtokovými technikami, a to metodou průtokové injekční analýzy (FIA) a sekvenční injekční analýzy (SIA), obě se spektrofotometrickou detekcí. Detekce ve viditelné oblasti světelného záření byla založena na tvorbě fialového chelatačního komplexu salicylanového a železitého iontu v prostředí mírně kyselého pH.

Bylo třeba nalézt optimální podmínky stanovení kyseliny acetylsalicylové na sestavené FIA a komerční SIA aparatuře. V souvislosti s tím určit základní charakteristiky obou metod, vzájemně porovnat dosažené výsledky (charakteristiky stanovení) a v neposlední řadě aplikovat optimalizované metody stanovení kyseliny acetylsalicylové pro analýzu reálných farmaceutických vzorků.

2 Teoretická část

2.1 Průtokové metody

Průtokové neseparační metody jsou kinetické metody analýzy založené na měření v proudě nosné kapaliny [1]. Pro analýzy může být použita každá chemická reakce, která je dostatečně citlivá a jejíž produkt je detekovatelný instrumentálními analytickými metodami, např. enzymatické, redoxní, katalytické reakce, tvorba komplexů aj. Průtokové analytické metody umožnily automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvýšit produktivitu zejména rutinních stanovení v analytických laboratořích.

Kontrolovaná disperze za přesně dodržovaných konstantních experimentálních podmínek zaručuje vysokou reprodukovatelnost výsledků, i když je mísení vzorku a činidla neúplné, chemická reakce nedosahuje rovnováhy a získaný signál je nestacionární [2]. Velmi výkonné a všestranné průtokové techniky jsou principiálně jednoduché, přitom obecně přesnější a spolehlivější než manuální provedení analýz. Vyloučení odměřování činidel a doplňování objemů výrazně snižuje spotřebu činidel a zvyšuje přesnost dílčích kroků.

Průtokové neseparační metody:

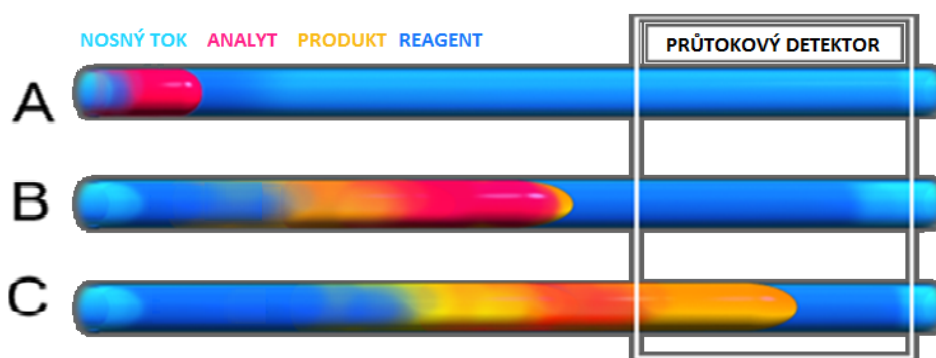
1. Metoda CFA – kontinuální průtoková analýza
2. Metoda SFA – segmentovaná průtoková analýza
3. Metoda FIA – průtoková injekční analýza
4. Metoda SIA – sekvenční injekční analýza
5. Metoda SI-LOV – Lab-on-Valve – analýza (laboratoř) na ventilu

Průtokové separační metody:

1. Metoda SIC – sekvenční injekční chromatografie
2. Metoda BI – bead injection

2.1.1 Průtoková injekční analýza

Druhá generace průtokových metod – průtoková injekční analýza (Flow injection analysis – FIA) [3] je založena na dávkování zóny kapalného vzorku dávkovacím ventilem do kontinuálního nesegmentovaného nosného proudu kapaliny vhodného složení [4]. Pohybem zóny vzorku v nosném toku dochází k smísení s reakčním činidlem, za vzniku detekovatelného produktu reakce vhodných analytických vlastností, viz. Obr. 2.1. Měřená fyzikální veličina se plynule mění v důsledku koncentračního gradientu reakčního produktu plynule unášeného detektorem. Zaznamenávaný signál má tvar píku, rozmytí je zapříčiněno disperzí nadávkovaných zón a nosného proudu, jehož výška a plocha závisí na koncentraci analytu. Detekce probíhá před dosažením chemické rovnováhy, proto je velice důležité jednotlivé kroky analýzy přesně časově definovat, aby byla zajištěna maximální možná reprodukovatelnost měření.



Obrázek 2.1 Schéma toku a disperze roztoků ve FIA [5]

A – nadávkování zóny analytu do nosného proudu s činidlem, B – smísení analytu a činidla, C – průchod koncentračního gradientu vytvářeného komplexu detektorem

Nejjednodušší systém FIA aparatury je tvořen peristaltickou pumpou generující jednosměrný konstantní tok nosného proudu rozlišného složení (voda, reakční činidlo, pufr, rozpouštědlo). Manuálním nebo programovatelným dávkovacím ventilem dochází k plnění dávkovací smyčky (DS) a následnému injikování přesného objemu vzorku do systému. Dávkovaný objem je limitován zajištěním důkladného promísení analytu s reakčním činidlem a zamezením rozdvojení píků, vlivem vytvoření produktu pouze na okrajích dávkované zóny vzorku (až stovky μL). Průtoková cela s mikrolitrovým

objemem, který zabraňuje rozmývání píku, s připojením detektoru umožňuje záznam signálu. Jednotlivé části aparatury nejčastěji propojují teflonové nebo polyethylenové hadičky o malém průměru (0,5 – 0,8 mm).

Způsob detekce FIA systém nijak neomezuje a bývá volen na základě vlastností analyzovaných látek a použitém chemismu reakce (UV/VIS spektrofotometrie, fluorimetrie, AAS, potenciometrie, konduktometrie,...). Převod vzorku do stavu vhodného k detekci a kvantifikaci se děje pomocí analytických operací kontinuálně přímo v průtokovém systému [6].

Převedení známého popsaného manuálního stanovení dané látky do uspořádání FIA vyžaduje experimentální ověření a optimalizaci jednotlivých parametrů majících na stanovení vliv [7]. Nejčastěji se jedná o objem dávkovaného vzorku, průtokovou rychlost, délku reakčních smyček (RS) modifikující disperzi zón a koncentraci činidel.

Výhody:

- jedna z velmi výkonných a všestranných technik (60 – 120 analýz za hodinu)
- principiálně jednoduchá, ekonomicky nenáročná
- automatizace chemických analýz vylučující subjektivního vlivu lidského faktoru
- uzavřený systém bránící kontaminaci vzorků
- krátká reakční doba

Nevýhody:

- nutný fyzický zásah do aparatury při změně objemu dávkovací nebo reakční smyčky
- nelze měnit podmínky v průběhu analýzy
- přímý kontinuální tok nosného proudu
- malá mechanická i chemická odolnost používaných propojujících hadiček vůči silným kyselinám, bázím a organickým rozpouštědlům
- větší spotřeba kontinuálně čerpaných činidel

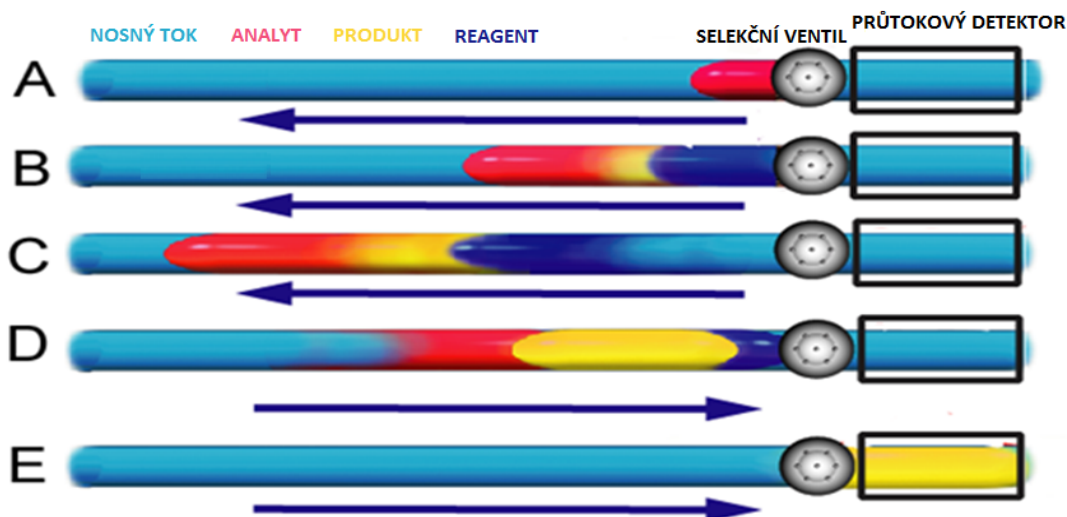
Jednoduchost, spolehlivost, robustnost a vysoká reprodukovatelnost FIA techniky poskytuje aplikace [8] v rozličných odvětvích lidské činnosti jako je potravinářství, zemědělství, zdravotnictví [7, 9-11], farmacie [12] (stanovení obsahu účinných látek [13], disoluční testy, zjišťování vazeb na bílkoviny), aj.

2.1.2 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential injection analysis – SIA) byla vyvinutá v roce 1990 kolektivem pracovníků z University of Whashington, pod vedením prof. Růžičky a Marshalla [1]. Tvoří vylepšenou druhou generaci průtokových metod vycházející z odstranění nedokonalostí z FIA a připojením řady dalších výhodných vlastností, z ní činící velmi praktickou, rychlou, téměř univerzální a progresivně se rozvíjející techniku. Odlišný princip SIA využívá měření v odlišných cyklech nesegmentovaného přímého a zpětného toku nosného proudu, za kontroly parciální disperze, vždy řízeného přesně a synchronně pomocí počítače.

Základ SIA systému tvoří jednokanálová nízkotlaká obousměrná pístová pumpa, spojená s dvoucestným selenoidním ventilem, navazující na mísící cívku a vícecestný selekční ventil propojený s průtokovou celou detektoru [5]. Nejběžnějším se stal šesticestný ventil, ale existují i ventily s 10 až 28 vstupy. Do průtokového systému mohou být zakomponovány prvky, které umožňují analytické operace přeměňující vzorek do stavu vhodného k detekci a kvantifikaci (např. ředění příliš koncentrovaných vzorků, zakoncentrování vzorků obsahujících stopové množství analytu, redukce, modifikace matrice, dialýza, plynová difúze, extrakce, reakce s imobilizovanými enzymy). Základními požadavky na pumpu v SIA systému jsou přesnost, reprodukovatelnost a obousměrný bezpulzní tok.

Pomocí synchronizovaně naprogramovaných pohybů pístové pumpy a přepínání pozic selekčního ventilu dochází k nasátí malých objemů vzorku a činidel do mísící cívky, která zabraňuje jejich vniknutí do pumpy [14]. Následná změna toku nosného proudu vyvolá důkladné promísení zón, s daleko menší disperzí než ve FIA, jak je patrné z Obr. 2.2. Činidly přeměněný analyt je transportován do průtokové cely detektoru. Řídícím programem složeným z příkazů pro pístovou pumpu a selekční ventil je u automaticky prováděných analýz zajištěna přesná synchronizace a opakovatelnost jednotlivých kroků, nezbytná pro získání reprodukovatelného koncentračního gradientu produktu vznikajícího v místě přerývu zón reagentů.



Obrázek 2.2 Schéma toku a disperze roztoků v SIA [5]

A, B – aspirace analytu a reakčních činidel, C – tvorba reakčního produktu na rozhraní nadávkovaných zón, D – promíchání zón opačným tokem nosného proudu, E – transport produktu do detektoru

Dávkování činidel selekčním ventilem propojujícím příslušné pozice po zvolenou dobu umožňuje pohodlně měnit aspirované objemy bez zásahu do aparatury. Použitím pumpy zajišťující obousměrný bezpulzní nosný tok poskytuje možnost zastavení transportu reagentů v jakékoliv fázi analýzy (Stopped-flow metoda), využíváno u reakcí s pomalou kinetikou.

Výhody:

- výrazně menší spotřeba vzorků i činidel je výhodná pro práci s drahými, vzácnými nebo nebezpečnými látkami – menší produkce odpadu
- robustnost, spolehlivost
- změna konfigurace v programovém nastavení
- díky zpětnému toku nižší disperze oproti FIA

Nevýhody:

- menší počet analýz za jednotku času
- vyšší nároky na počítačovou techniku a programové ovládání

Od roku 1990 bylo publikováno téměř sto prací zabývajících se automatickým stanovením většiny běžných anorganických iontů, organických látek, farmaceutických účinných látek [15]. Aplikace techniky SIA [16] se uplatňují v nepřeberném množství analýz např. disoluční a stabilitní testy lékových forem [17, 18], analýzy vod [19] a potravin [20, 21], on-line předúprava vzorků [22], složek životního prostředí [23] a mnoho dalších bioanalytických, diagnostických a kontrol kvality.

2.1.3 Lab-on-Valve

Třetí generace průtokových metod přinesla převratné řešení v podobě Lab-on-Valve jednotky (LOV) [24]. Tato modifikace SIA systému zahrnující soustředění dávkovacích kanálů, včetně průtokové detekční cely o průměru 0,5 mm, přímo na vícecestném selekčním ventilu, pomocí ukotveného plastového bloku. LOV jednotka umožňuje zmenšení průtokových částí systému a díky velkému poměru objemu k ploše nedochází k ucpávání kanálků, zvláště při použití složitějších matic. Miniaturizace rozměrů přispívá ke zmenšování objemů reagentů (μL) i vlastní aparatury. Celý systém je tvořen pístovou pumpou, zadržovací smyčkou (ZS), selekčním ventilem s LOV jednotkou a detektorem.

SIA-LOV je využívána jako základ pro mikroSIA, Bead Injection, sekvenční injekční afinitní chromatografii (SIC). Lze použít spektrofotometrickou i fluorescenční detekci. Uplatnění postupně nalézá v analytických i farmaceutických analýzách a jako dávkovací prvek v elektronové hmotnostní spektrometrii a kapilární elektroforéze [3].

Publikované aplikace zahrnují bioanalytické testy v medicíně, farmacii, životním prostředí a analýze potravin [25].

2.2 Molekulová absorpční spektrofotometrie

Spektrometrie je díky své rychlosti, experimentální nenáročnosti a citlivosti jednou z nejvíce využívaných metod při stanovování látek v roztocích [4]. Princip metody spočívá v absorpci elektromagnetického záření (Obr. 2.3) v ultrafialové a viditelné oblasti (200 až 800 nm). Pozorovaná barva látek odpovídá doplňkové barvě pro barvu absorbovaného záření v rozsahu 380 – 770 nm.

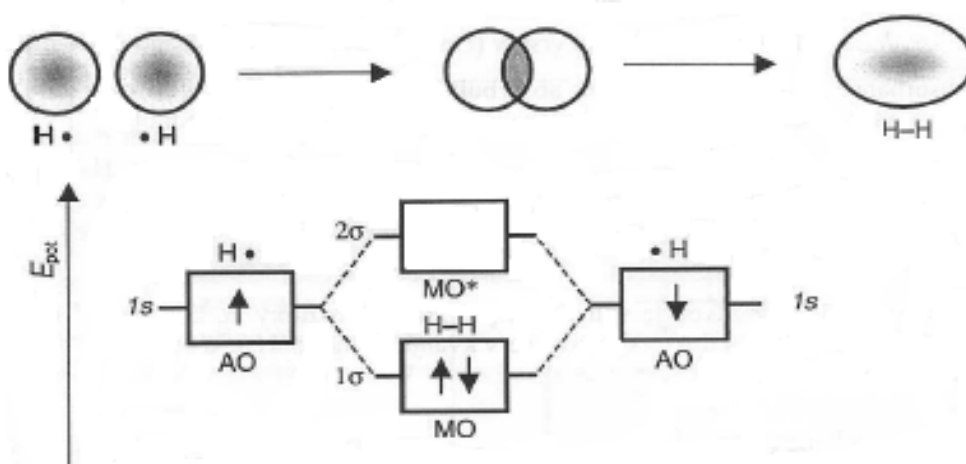
E [eV]									
	10^4		10^2		10^0		10^{-2}		10^{-4}
$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹]									
	10^8		10^6		10^4		10^2		10^0
ν [Hz]									
		10^{18}		10^{16}		10^{14}		10^{12}	10^{10}
λ									
	0,1 nm		200 nm	400 nm	800 nm	2,5 μ m	25 μ m	500 μ m	1 cm
Záření:									
rentgenové	vakuové		blízké	viditelné	blízké	střední	daleké	mikrovlnné	
	ultrafialové				infračervené			radiofrekvenční	
rentgenová spektrometrie	ultrafialová a viditelná spektrometrie				infračervená spektrometrie		elektronová paramagnetická rezonance		nukleární magnetická rezonance

Obrázek 2.3 Elektromagnetické záření a příslušné spektrometrické metody [26]

Přímé stanovení analytu je umožněno obsahem charakteristických skupin v molekule organických látek (chromofory), umožňujících absorpci záření určité vlnové délky, poskytující dostatečnou energii pro převedení do excitovaného stavu. Až na výjimky kovy tuto schopnost nemají, proto se stanovují jako produkty reakcí s organickými látkami, poskytující barevné komplexy.

2.2.1 Molekulové orbitály a spektra

Interakcí dvou atomových orbitalů vznikají dva molekulové orbitály (MO , MO^*) s různou energií, viz. Obr 2.4.



Obrázek 2.4 Vznik molekulových orbitalů vodíku [27]

Za normálních podmínek se molekula nachází v základním elektronovém stavu, tvořený součtem elektronové, vibrační a rotační energie, a vazebný el. pár je obsažen ve vazebném MO s nižší energií.

Absorpce záření potřebné energie excituje molekuly na vyšší el. hladiny MO^* , které jsou štěpeny na vibrační energetické podhladiny vibračním pohybem atomů kolem svých rovnovážných poloh daných chemickou vazbou [26]. Molekula jako celek vykonává také rotační pohyb štepící vibrační hladiny na rotační podhladiny. Rozdíl energie mezi jednotlivými hladinami je velmi malý a platí, že $\Delta E_{\text{rot}} \ll \Delta E_{\text{vibr}} \ll \Delta E_{\text{el}}$. UV/VIS záření poskytuje dostatečnou energii ke změně elektronového stavu molekuly.

Výsledné detekované spektrum absorbovaného záření se jeví jako pásové z důvodu splývání jednotlivých přechodů [27]. V roztocích jsou výsledné pásy širší vlivem solvatovaného rozpouštědla na vibrace a rotace molekuly.

2.2.2 Lambert-Beerův zákon

Měření absorbovaného monochromatického záření určené podílem světelného toku propuštěného látkou po absorpci Φ a vstupujícího toku Φ_0 je definováno jako transmittance – T (2.1).

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (2.1)$$

Dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmittance se nazývá absorbance – A (2.2).

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = -\log T \quad (2.2)$$

Pro posuzování absorpce záření vzorkem je měřená velikost jedné z těchto veličin vynášena v závislosti na vlnových délkách použitého záření jako absorpční spektrum umožňující kvalitativní analýzu. Kvantitativní analýzu lze provést na základě vztahu Lambert-Beerova zákona, definující absorbanci přímo úměrnou koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy, rovnicí (2.3),

$$A = \varepsilon \times c \times L \quad (2.3)$$

kde c je molární koncentrace [mol L^{-1}], L délka absorbující vrstvy [cm], ε molární absorpční koeficient [$\text{L cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$].

Absorbance je aditivní veličina, obsahující součet absorbancí všech látek v roztoku, které přispívají absorpci záření dané vlnové délky.

2.3 Kyselina acetylsalicylová

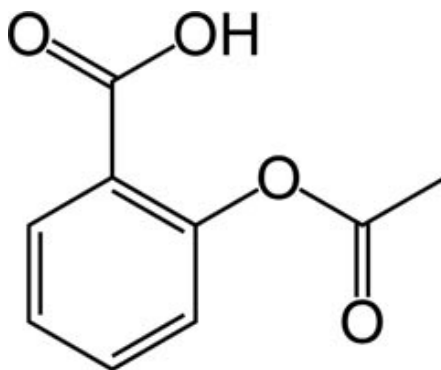
Acidum acetylsalicylicum (synonymum *Acidum acetylosalicylicum*)

Je to kyselina 2-acetoxybenzoová, Obr. 2.5.

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_8O_4$.

M = 180,16

CAS 50-78-2



Obrázek 2.5 Kyselina acetylsalicylová, kyselina 2-acetyloxybenzoová

Substitucí vodíku fenolického hydroxyly kyseliny salicylové pomocí acetanhydridu vzniká jeden z nejvýznamnějších derivátů kyseliny acetylsalicylové [28]. Vznikající bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly kyseliny ($pK_a = 3,5$) jsou obtížně rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v ethanolu 96%, dobře rozpustné v etheru. Taje při asi 143 °C (stanovení v kovovém bloku) [29]. Vlivem vzdušné vlhkosti, světla a tepla dochází k pozvolnému rozkladu kyseliny acetylsalicylové za odštěpení acetylové skupiny na slabě, růžově zbarvenou směs kyseliny salicylové a octové. Hydrolyza je urychlována kyselým prostředím, které je poskytováno samotnou povahou sloučeniny [30].

Kyselina acetylsalicylová je látka mající všechny vlastnosti typické pro nesteroidní protizánětlivé látky, jejichž účinnost společně s analgetiky-antipyretiky, je s ní jako standardem porovnávána [31]. Farmakologické vlastnosti ASA mající v lidském organismus analgetické, antipyretické, ve vyšších dávkách protizánětlivé a v malých dávkách antiagregační účinky [32].

Mechanismus účinku kyseliny acetylsalicylové je tvořen neselektivní inhibicí cyklooxygenasy. Acetylace aktivního místa izoformy COX-1 vede k ireverzibilní blokádě [31]. Cyklooxygenasa je klíčový enzym odpovědný za vznik prostanoidů účastnících se řady fyziologických procesů s významným podílem na rozvoji horečky, bolesti a zánětu.

Nejzávažnějším vedlejším účinkem ASA je vznik Reyerova syndromu u dětí do 12-ti let [33]. Dále se mohou při užívání tohoto léku objevit gastroduodenální potíže, krvácení, porucha krvetvorby a pseudoalergické stavy (astma, vyrážka,...) způsobené změnou tvorby eikosanoidů.

Resorpce kyseliny acetylsalicylové pokožkou i stěnou žaludku a střeva probíhá velmi rychle převážně v nezměněném stavu, kdy maxima dosahuje do 2 hodin po per os podání [28]. Různě substituované deriváty kyseliny salicylové podléhají v organismu hydrolyze na volnou kyselinu, vylučovanou ledvinami z 10 % v nezměněné formě, dále jako etherglukuronid, esterglukuronid a glykolovou konjugací ve formě kyseliny salicylurové. Salicyláty mohou volně přecházet přes placentární bariéru i do mateřského mléka.

2.3.1 Vznik chelatačních komplexů

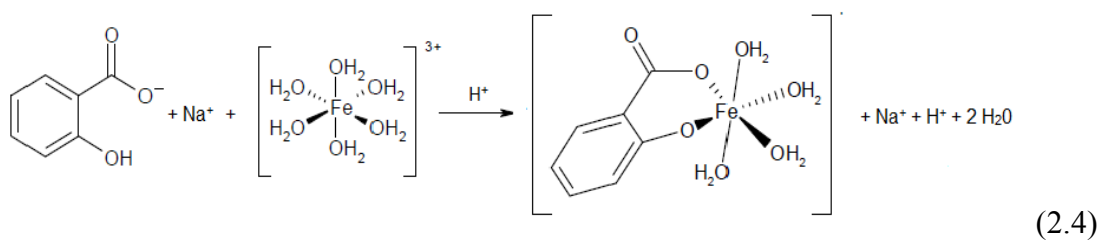
Roztoky aromatických hydroxysloučenin tvoří s železitými ionty charakteristické barevné reakce dané tvorbou komplexních sloučenin. Této vlastnosti se využívalo ke stanovení fenolu reakcí s chloridem železitým, pod názvem Uffelmannovo činidlo. Karboxyl a hydroxyl v *orto*- poloze zajišťuje schopnost salicylanů tvořit stejné chelatační komplexy.

Většina komplexních sloučenin využívaných v analytické chemii obsahuje jeden centrální atom (iont kovu) a množství navázaných ligandů ovlivňuje jejich koncentrace v roztoku [4]. Rozdílných vlastností kovového iontu vázaného v komplexu od volné formy lze využít v analytických metodách.

Cheláty jsou komplexy, ve kterých se na centrální iont váže jeden ligand prostřednictvím dvou nebo více donorových atomů, za vzniku chelátového kruhu. Nejstabilnější komplexy obsahují pět nebo šest chelátových kruhů vytvořených z pěti nebo šesti donorových atomů.

V roztoku jsou centrální iont i ligandy solvatovány molekulami rozpouštědla blokující elektronový pár nutný pro vytvoření vazby mezi koordinačními místy obou částic [34]. Ligand představuje bázi (L) umožňující vázat oxoniový iont (H_3O^+) a v roztoku být ve formě ligandové kyseliny (HL), oproti hydratovanému centrálnímu iontu (M), tvořící kyselinu schopnou hydrolyzovat za vzniku hydroxidových komplexů (OH^-). Pro přijetí jednodonorového ligandu je tedy nutné odštěpit jednu molekulu koordinovaného rozpouštědla z centrálního atomu. Míru uvolněných molekul koordinovaného rozpouštědla v jejich nadbytku detekovat nelze, ale změřením pH roztoku je možné kvantitativně stanovit uvolněné H_3O^+ ionty.

Velice omezená disociace kyseliny acetylsalicylové v silně kyselém prostředí a vysoké koncentrace vodíkových kationtů způsobují vytěsnění centrálního iontu železa z komplexu [35]. V mírně kyselém prostředí vzrůstá disociace ASA (pH 3,5 \approx 50 % v ionizované formě) a tím kompetice salicylanových ligandů o vazbu do koordinačního místa centrálního iontu s H_3O^+ . Podle rovnice (2.4) vzniká monojaderný, dvoudonorový, kladně nabitý komplex $\text{Fe}(\text{SAL})^+$ s koordinačním číslem dvě. Postupným zvyšováním pH narůstá obsah volného ligandu SAL^- v roztoku což umožňuje vznik vyšších komplexů $\text{Fe}(\text{SAL})_2^-$ a $\text{Fe}(\text{SAL})_3^{3-}$. V extrémně alkalickém prostředí vysoká koncentrace ligandů OH^- postupně vytěsňuje salicylanové ligandy za tvorby směsných komplexů (typu $\text{ML}_x(\text{OH})_y$). Může docházet i celkovému rozkladu a převodu salicylanového chelátu na hydroxidový komplex.



Při pH nižší než 2 komplex nevzniká, v rozmezí pH 2 až 4 – tvorba fialového $\text{Fe}(\text{SAL})^+$, pH mezi 4 až 9 převažuje tmavě červený $\text{Fe}(\text{SAL})_2^-$ a při pH vyšším než 9 je dominantní formou oranžový $\text{Fe}(\text{SAL})_3^{3-}$ [36].

2.3.2 Metody stanovení kyseliny acetylsalicylové

2.3.2.1 Lékopisné zkoušky totožnosti

Převzato z Českého lékopisu [29].

A. Infračervená absorpční spektrofotometrie. Porovnání s kyselinou acetylsalicylovou CRL.

B. Ke 0,2 g se přidají 4,0 ml hydroxidu sodného zředěného RS a roztok se 3 minuty vaří. Po ochlazení se přidá se 5,0 ml kyseliny sírové zředěné RS. Vyloučená krystalická sraženina se odfiltruje, promyje a vysuší při 100 °C až 105 °C. Teplota tání je 156 °C až 161 °C.

C. 0,1 g se promísí ve zkumavce s 0,5 g hydroxidu vápenatého R. Směs se poté zahřívá, vyvíjejí se dýmy, které zbarví filtrační papír navlhčený 0,05 ml nitrobenzenaldehydu RS zelenomodře nebo zelenožlutě. Zabarvení papíru se zvlhčení kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS změní na modré.

D. Asi 20 mg sraženiny ze zkoušky B se zahřátím rozpustí v 10,0 ml vody R a ochladí se. Tento roztok vyhovuje zkoušce na salicyláty (K 1 mL předepsaného roztoku se přidá 0,5 mL roztoku FeCl_3 PS1; vznikne fialové zbarvení, které se přidáním 0,1 mL kyseliny octové RS nezmění).

2.3.2.2 Lékopisné stanovení obsahu

Převzato z Českého lékopisu [29].

1,000 g se rozpustí v baňce se zabroušenou zátkou v 10,0 ml lihu 96% R a přidá se 50,0 ml hydroxidu sodného 0,5 mol L⁻¹ VS. Baňka se uzavře a nechá se stát 1 h. Potom se přidá 0,2 ml fenolftaleinu RS jako indikátoru a titruje se kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol L⁻¹ VS. Provede se slepá zkouška. 1 ml hydroxidu sodného 0,5 mol L⁻¹ VS odpovídá 45,04 mg $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$.

2.3.2.3 Další metody stanovení

V Tab. 2.1 jsou uvedeny další publikované metody stanovení kyseliny acetylsalicylové pomocí průtokového uspořádání měření.

Tab. 2.1 Metody stanovení acetylsalicylové kyseliny

Vzorek	Metoda stanovení	Detekce	Lineární rozsah	LOD	Citace
tableta	FIA, Fe^{3+}	529 nm	25 – 250 mg L^{-1}	4,0 mg L^{-1}	[37]
–	SPE, lantanoidy	Luminiscence	–	0,045 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[38]
tableta	Kinetická spektrofotometrie cobalt(II)-1-nitroso- 2-naphthol	410 nm	0,72 – 9,0 mg L^{-1}	0,35 mg L^{-1}	[39]
tableta	SIA, Průtoková Salicylát selektivní elektroda	Potenciometrie	0,05 – 10 $\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$0,05 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}	[40]
tableta	FIA, Průtoková Salicylát selektivní elektroda	Potenciometrie	0,05 – 50 $\times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	–	[41]
tableta	FIA, ISE	Potenciometrie	4,0 – 40 $\times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	–	[42]
tableta	FIA, Kompozitní uhlíková elektroda, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Potenciometrie	1,0 – 5,0 $\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}	[43]
ASA	FIA, SPE	297 nm	5 – 120 mg mL^{-1}	0,135 mg mL^{-1}	[44]
sérum	SPE, Fe^{3+}	–	0,025 – 1,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$5,5 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	[45]

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a roztoky

Použité chemikálie a roztoky tvořily Salicylan sodný 99% (Penta, ČR), dusičnan železitý nonahydrát 97% (Sigma-Aldrich, USA), kyselina sírová 95% (Merck, Německo), hydroxid sodný p.a. (Chemapol, ČR), Robinsonův–Britonův univerzální pufr (k dispozici v laboratoři) [46], deionizovaná voda, Acifein® (Herbacos Recordati, ČR), Anopyrin® 400 mg (Zentiva, SK), Acylpyrin® (Herbacos Recordati, ČR).

3.2 Přístroje a programy

Měření bylo provedeno pomocí spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent Technologies 2001-2010, USA), mini deuterium halogenového zdroje záření DT-MINI-2GS 200 – 1100 nm s vláknovou optikou (Ocean Optics, USA), spektrometru HR 4000 (Ocean Optic, USA), optických vláken QP-600-2-UV/VIS-SR o průměru 600 µm (Ocean Optics, USA), semi-mikro analytických vah Sartorius RC 210 D (Sartalex, ČR), komerční aparatury FIA/SIA FIA Lab 3500 (FIALab Instruments, USA), pH metru AD 1000 (Adwa, Maďarsko), ultrazvukové čističky Elmasonic E30 H (Elma, Německo), aparatury na deionizovanou vodu Mili QPLUS (Milipore, USA). Aparatura FIA se skládala z peristaltické pumpy C. P. 78017-20 (Ismatec, USA), peristaltické pumpy Masterflex L/S (Cole-Parmer instrument company, USA) průtokové 1 cm Z-cely (Ocean Optic, USA), šesticestného nízkotlakého dávkovacího ventilu 5125 (Rheodyna, USA), teflonových dávkovacích a reakčních smyček o objemu 40; 100; 150; 250; 330 a 400 µL (průměr hadičky 0,5 mm) vlastní výroby (VICI Valco, USA), propojujících tygonových hadiček (průměr 0,76 mm) (Cole-Parmer, USA), T-spoje.

K ovládání přístrojů a vyhodnocení dat sloužily programy UV-Visible ChemStation B.04.01 (61) (Agilent Technologies 2001-2010, USA), řídicí software FIALab pro Windows 5.0 (FIALab Instruments, USA), SpectraSuite (Ocean Optic, USA), Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) a Origin 6.0 (OriginLab, USA).

3.3 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok o koncentraci $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ **salicylanu sodného (SALNa)**, $\text{C}_6\text{H}_4\text{OHCOONa}$ ($M_r = 160,11$), byl připraven rozpuštěním 0,1 g pevného SALNa v deionizované vodě a doplněním do 250 mL odměrné baňky.

Zásobní roztok o koncentraci $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ **kyseliny sírové**, (H_2SO_4) ($M_r = 98,08$; $\rho = 1,834 \text{ g cm}^{-3}$), byl připraven naředěním 40 mL 95% kyseliny sírové deionizovanou vodou v 250 mL v odměrné baňce.

Zásobní roztok vybarvovacího činidla (VČ):

- o koncentraci $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ **dusičnanu železitého**, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ ($M_r = 403,99$), v $12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ **kyselině sírové**, byl připraven rozpuštěním 0,505 g pevného dusičnanu železitého v deionizované vodě, přidáním 1,0 mL $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ kyseliny sírové a doplněním deionizovanou vodou v 250 mL odměrné baňce
- o koncentraci $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ **dusičnanu železitého**, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ ($M_r = 403,99$), **BEZ přidavku kyseliny sírové**, byl připraven rozpuštěním 0,202 g pevného dusičnanu železitého a doplněním deionizovanou vodou v 100 mL odměrné baňce
- o koncentraci $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ **dusičnanu železitého**, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ ($M_r = 403,99$), v $12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ **kyselině sírové**, byl připraven rozpuštěním 0,253 g pevného dusičnanu železitého v deionizované vodě, přidáním 1,0 mL $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ kyseliny sírové a doplněním deionizovanou vodou v 250 mL odměrné baňce
- o koncentraci $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ **dusičnanu železitého**, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ ($M_r = 403,99$), v $12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ **kyselině sírové**, byl připraven rozpuštěním 1,01 g pevného dusičnanu železitého v deionizované vodě, přidáním 1,0 mL $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ kyseliny sírové a doplněním deionizovanou vodou v 250 mL odměrné baňce

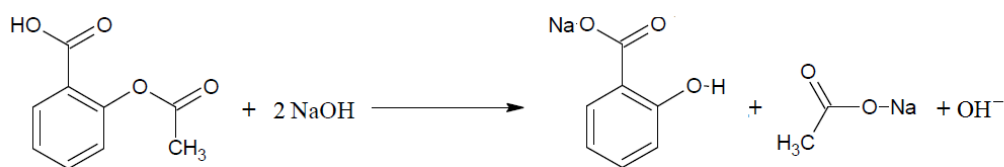
Zásobní roztoky byly uchovávány při laboratorní teplotě v uzavřených PE lahvích, chráněné před světlem. Pracovní roztoky požadovaných koncentrací SALNa byly připravovány ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou.

Pro měření v průtokovém uspořádání byly všechny použité roztoky vloženy na 20 min. do ultrazvukové lázně, z nutnosti snížení obsahu rozpuštěných plynů v roztocích a tím i omezení tvorby bublinek v aparatuře.

3.4 Rozklad vzorku

Rozklad tablet farmaceutických vzorků metodou alkalické hydrolyzy způsobil převod kyseliny acetylsalicylové na její sodnou sůl. Salicylanový iont poskytuje s železitými ionty komplex absorbující kvanta viditelného světelného záření.

Reakcí kyseliny acetylsalicylové s hydroxidem sodným za zvýšené teploty dochází k její hydrolyze na kyselinu salicylovou a následné neutralizaci, za vzniku salicylanu sodného a octanu sodného, patrné z rovnice (3.1).



(3.1)

Tableta každého vzorku farmaka byla zvážena s přesností na 4 desetinná místa a v příslušné zkumavce k ní byl přidán odpovídající objem $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ roztoku hydroxidu sodného (1,308 g NaOH v 32,7 mL deionizované H_2O). Do každé zkumavky byla vložena skleněná tyčinka a proces hydrolyzy podpořen promícháním roztoku. Vodní lázeň, s vloženými zkumavkami, obsahující rozložené tablety, byla následně zahřáta těsně pod bod varu (cca 95°C). Zkumavky v ní byly ponechány po dobu 10 minut, z důvodu zajištění doby potřebné pro kvantitativní hydrolyzu kyseliny acetylsalicylové a převedení na salicylan sodný.

Po hydrolyze byly obsahy zkumavek kvantitativně převedeny do 500mL odměrných baněk, doplněny deionizovanou vodou a promíchány. V posledním kroku došlo k odpipetování předem určených objemů hydrolyzátů do 50mL odměrných baněk. Po doplnění deionizovanou vodou byly tyto roztoky použity při měření reálných farmaceutických vzorků.

3.5 Statické uspořádání měření

Měření absorpčních spekter roztoků probíhalo v 1 cm křemenné kyvetě za použití spektrofotometru Agilent 8453, ovládaném pomocí programu UV-Visible ChemStation, v rozsahu vlnových délek 200 – 800 nm. Pracovní roztoky a kalibrační řady SALNa byly připraveny ředěním $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ zásobního roztoku (Tab. 3.1) deionizovanou vodou na požadované koncentrace. Není-li uvedeno jinak bylo k roztokům SALNa přidáno 5,0 mL vybarvovacího činidla o koncentraci $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dusičnanu železitého s upraveným pH kyselinou sírovou (výsledná koncentrace $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ v $12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ H_2SO_4).

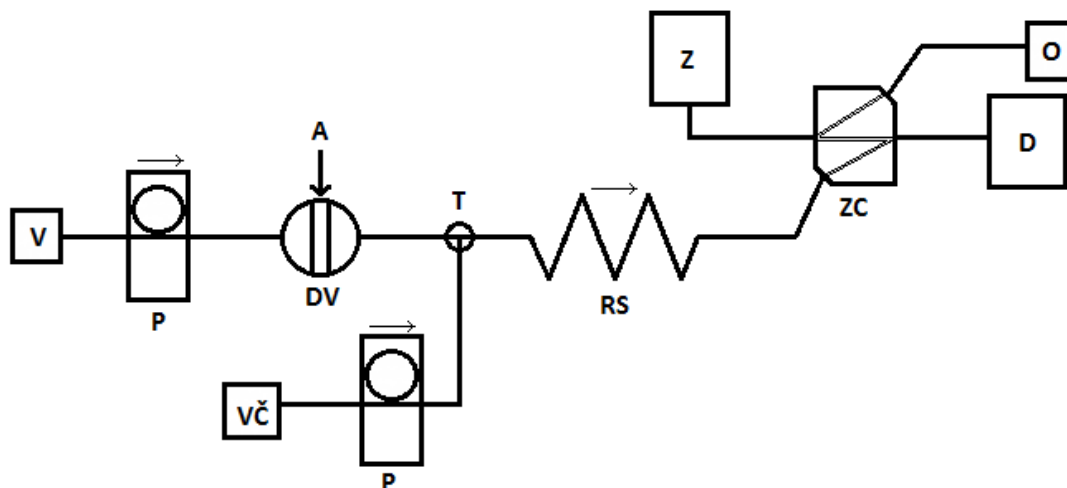
Tabulka 3.1 Ředění $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ zásobního roztoku salicylanu sodného

Koncentrace SALNa [$\times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$]	Objem $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa [mL]
1,0	1,0
2,0	2,0
3,0	3,0
4,0	4,0
5,0	5,0

3.6 Uspořádání měření FIA

V sestavené aparatuře pro stanovení kyseliny acetylsalicylové pomocí železitých iontů v kyselém prostředí ve FIA uspořádání, byly použity peristaltické pumpy C. P. 78017-20 (Ismatec) a Masterflex L/S (Cole-Parmer instrument company), dále zdroj záření DT-MINI-2GS 200-1100 nm (Ocean Optics) s vláknovou optikou QP-600-2-UV/VIS-SR (Ocean Optics) o průměru 600 μm umožňující propojení se spektrofotometrem HR 4000 (Ocean Optic). Tygonové hadičky o průměru 0,76 mm (Cole-Parmer) vzájemně propojovaly lahve pracovních roztoků, jednotlivé pumpy, šesticečný dávkovací ventil 5125 (Rheodyna) reakční smyčku a průtokovou 1 cm Z-celou (Ocean Optic) až po odpadní nádobu. Nosný tok představovaný konstantním proudem deionizované vody (tvořen díky peristaltické pumpě Masterflex L/S, Cole-Parmer) společně s nepřetržitě zaváděným roztokem vybarvovacího činidla těsně před detekční průtokovou celou (zajištěno druhou peristaltickou pumpou C. P. 78017-20, Ismatec). Schéma aparatury je dále znázorněno na Obr. 3.1.

3.6.1 Schéma aparatury FIA



Obrázek 3.1 Schéma aparatury FIA se spektrofotometrickou detekcí

A – analyt, *D* – detektor, *DV* – nízkotlaký šesticestný dávkovací ventil, *O* – odpad, *P* – peristaltická pumpa, *RS* – reakční smyčka, *T* – T spoj, *V* – deionizovaná voda, *VČ* – vybarvovací činidlo $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ v H_2SO_4 , *Z* – zdroj UV/VIS záření, *ZC* – průtoková Z-cela

3.6.2 Postup experimentu

Výchozí stav aparatury FIA tvořil volný průtok deionizované vody s kontinuálně zaváděným tokem vybarvovacího činidla, spojovacím vedením, reakční smyčkou a průtokovou celou až do odpadu, kdy dávkovací ventil v pozici 1 spojující cestu 2 – 3 (schéma Tab. 3.2) brání průtoku nosného proudu dávkovací smyčkou.

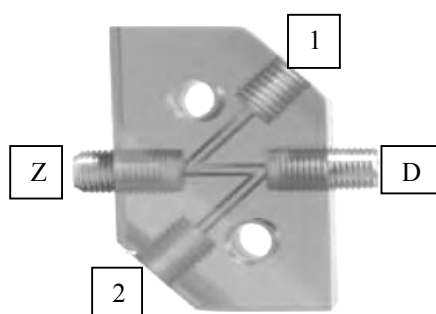
Tabulka 3.2 Schéma nízkotlakého šesticestného ventilu

Pozice ventilu	Číslo na spodní části ventilu
dávkovací smyčka	1, 4
vstup nosného toku	2
výstup nosného toku	3
odpad při plnění dávkovací smyčky	5
vstup při plnění dávkovací smyčky	6

Manuálním přepnutím ventilu do pozice 2 (propojeny cesty 2 – 1 a 4 – 3) dochází průtokem deionizované vody k vymytí zóny příslušného objemu (určen objemem dávkovací smyčky) dávkovaného roztoku (SALNa , vzorek farmaka) do proudu vody. Těsně před vstupem zóny roztoku do reakční smyčky dochází k interakci s kontinuálně

zaváděným roztokem vybarvovacího činidla. Reakční smyčka zajišťovala dostatečné promísení nadávkované zóny s přiváděným roztokem vybarvovacího činidla. Vznikající barevný komplex byl následně detekován průchodem optickou dráhou průtokové Z-cely (Obr. 3.2) a odveden do odpadní nádoby. Průchod vznikajícího komplexu je zaznamenáván ve tvaru píku, jako nárůst absorbance při zvolené vlnové délce.

V programu SpectraSuite, umožňujícím ovládání spektrofotometru, záznam a ukládání signálu měření, byla pro všechny experimenty nastavena hodnota vlnové délky 529 nm (experimentálně zjištěna ve statickém uspořádání), odpovídající maximální odezvě absorbance a Boxcar Width (BW) 10. Základní linii tvořil nosný tok deionizované vody s kontinuálně zaváděným roztokem vybarvovacího činidla.



Obrázek 3.2 Průtoková Z-cela

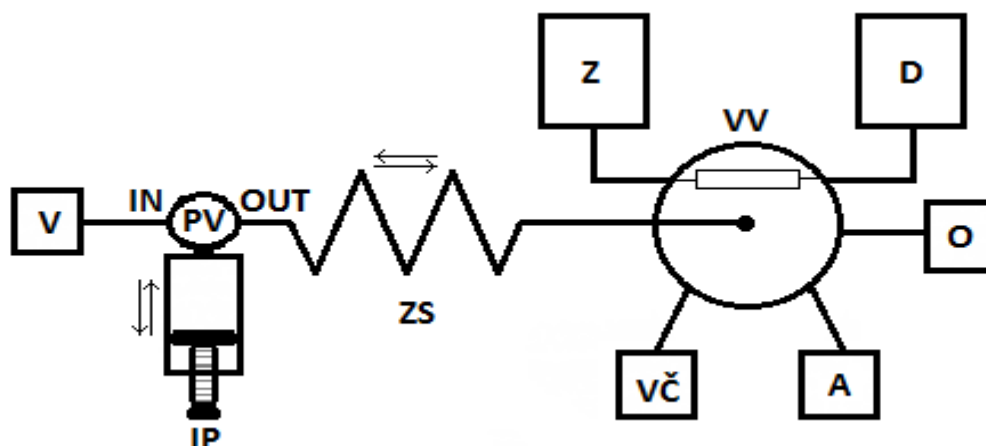
1 – výstup nosného toku do odpadu, 2 – vstup nosného toku z reakční smyčky, D – vstup světelného paprsku do detektoru, Z – vstup světelného paprsku ze zdroje

3.7 Uspořádání měření SIA

Pro stanovení kyseliny acetylsalicylové železitými ionty v kyselém prostředí, zajištěném přídavkem kyseliny sírové, byla využita komerčně sestavená aparatura FIA/SIA FIA Lab 3500 (FIALab Instruments) umožňující měření v uspořádání FIA i SIA modu.

Schéma SIA-LOV aparatury, tvořené 1mL injekční „syringe“ pumpou, dvoucestným prepínacím ventilem propojeným zadržovací smyčkou s vícecestným selekčním ventilem obsahující integrovanou LOV průtokovou celu, je zobrazeno na Obr. 3.3. Ke spektrofotometrické detekci komplexu stanovované kyseliny byl využit externí zdroj DT-MINI-2GS (Ocean Optic) připojen pomocí optických vláken k průtokové LOV cele a externímu detektoru HR 4000 (Ocean Optic).

3.7.1 Schéma aparatury SIA-LOV



Obrázek 3.3 Schéma SIA-LOV aparatury se spektrofotometrickou detekcí

A – analyt, D – detektor, IP – injekční pumpa, O – odpad, PV – dvoucestný přepínací ventil, V – deionizovaná voda, VČ – vybarvovací činidlo $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ v H_2SO_4 , VV – vícecestný ventil s LOV průtokovou celou, Z – zdroj UV/VIS záření, ZS – zadržovací smyčka

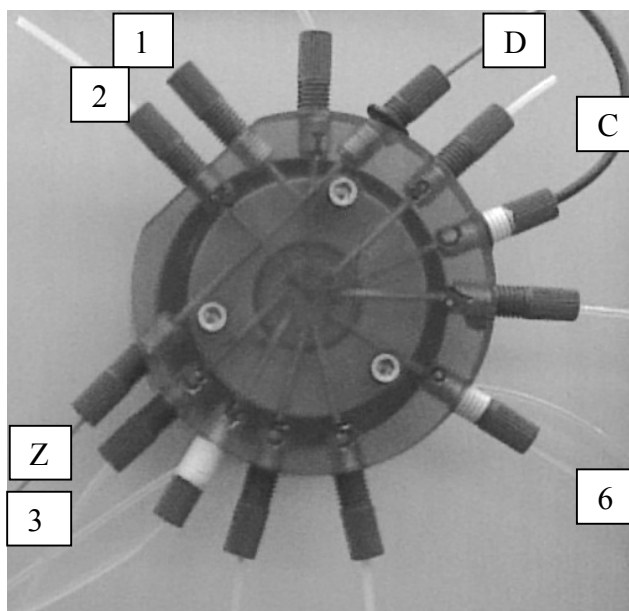
3.7.2 Postup měření

V prvním kroku byla aparatura SIA-LOV důkladně propláchnuta nosným roztokem deionizované vody. Vlastní analýzy se sestávaly z propojení centrální pozice vícecestného selekčního ventilu s pozicí 3 (Obr. 3.4) odpovídající roztoku vybarvovacího činidla a pohybem injekční pístové pumpy docházelo k nasátí roztoku do zadržovací smyčky. Po 5s časové prodlevě následovalo propojení centrální pozice selekčního ventilu s pozicí 6 pro vzorek (roztok SALNa, farmaka, deionizované vody – blank), pohybem „syringe“ pumpy ve stejném směru jako v předchozím kroku byla do zadržovací smyčky nasáta zóna vzorku o daném objemu a opět 5 s vyčkáno. Následné přepnutí dvoucestného přepínacího ventilu do polohy IN umožnilo doplnění zbylého objemu injekční pumpy deionizovanou vodou. V poslední fázi analýzy došlo ke změně pozice přepínacího ventilu na OUT a propojení centrální pozice selekčního ventilu s pozicí 2 (průtoková cela). Zpětný chod „syringe“ pumpy působil efektivní promísení obou zón reaktantů a tím podpořil tvorbu barevného komplexu vznikajícího na styčné ploše obou zón. Přítomnost vzniklého komplexu byla, díky pohybu nosného toku, zaznamenávána při průchodu optickou dráhou světelného paprsku v detektoru a dále byl komplex odváděn do odpadní láhve. Závěrečné kroky zahrnující změnu

dvoucestného ventilu do polohy IN, nasátí naprogramovaného objemu deionizované vody, návrat přepínacího ventilu do polohy OUT a zpětný chod injekční pumpy vedly k finálnímu promytí celé aparatury.

Pro ovládání externího detektoru, zobrazení a záznam signálu ve tvaru píku byl použit program SpectraSuite. Intenzity absorbance roztoků byly měřeny při konstantně nastavené vlnové délce 529 nm a blank tvořila absorbance naměřená při nadávkování deionizované vody místo vzorku. Základní linie byla nastavena na hodnotu absorbance deionizované vody.

Automatický cyklus aparatury SIA-LOV umožněný programem FIALab byl navržen postupným výběrem předem nadefinovaných jednoduchých povelů pro jednotlivé kroky analýzy, s možností použití grafického rozhraní pro manuální ovládání.



Obrázek 3.4 Schéma SIA-LOV ventilu

1 – odpad, 2 – průtoková cela, 3 – vybarvovací činidlo, 6 – vzorek, C – zadržovací smyčka, D – vstup paprsku do detektoru, Z – výstup paprsku ze zdroje záření

4 Výsledky měření a diskuse

Podstatou spektrofotometrického stanovení kyseliny acetylsalicylové v této diplomové práci je schopnost salicylanového iontu vytvářet barevné chelatační komplexy s Fe^{3+} v mírně kyselém prostředí. Vznikající komplex absorbuje ve viditelné části světelného spektra, čehož lze v analýze využít ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení.

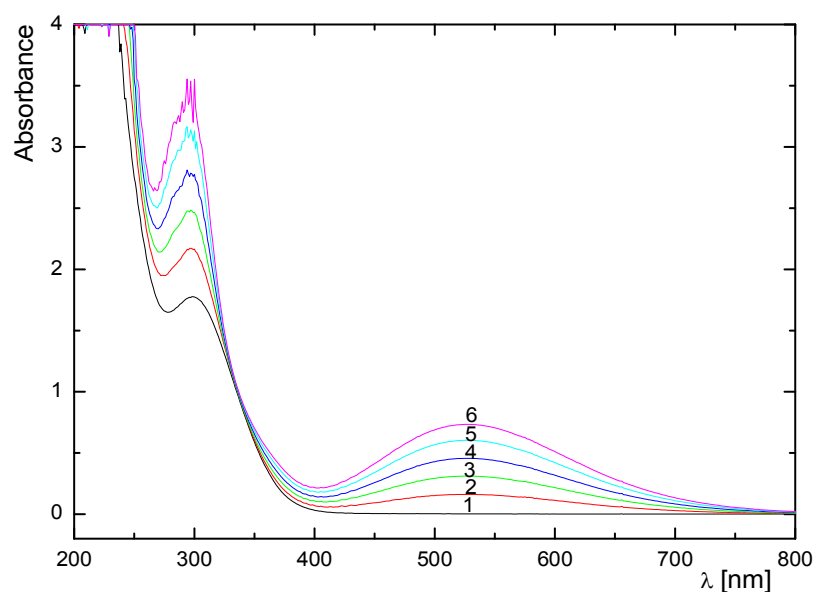
Záznam signálu měření z detektoru byl vyhodnocován dle tvaru a výšky píku, nikoliv plochy, z důvodu deformace tvaru píku při průchodu vzduchové bublinky průtokovou celou v průběhu analýzy. Tento efekt byl největší překážkou v optimalizaci obou průtokových metod.

4.1 Statické uspořádání měření

Prvotní analýzy ve statickém uspořádání sloužily k zjištění základních vlastností dané reakce umožňující spektrofotometrické stanovení kyseliny acetylsalicylové ve viditelné oblasti záření. Není-li uvedeno jinak bylo k roztokům SALNa přidáno 5,0 mL vybarvovacího činidla o koncentraci $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dusičnanu železitého s upraveným pH kyselinou sírovou (výsledná koncentrace $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fe(NO}_3)_3$ v $12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$).

4.1.1 Absorpční spektrum Fe(SAL)^+ a vybarvovacího činidla

Kalibrační roztoky SALNa o koncentraci 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ s přídavkem vybarvovacího a samotné vybarvovací činidlo ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dusičnan železitý v $12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ kyselině sírové) byly proměřeny v ultrafialové a viditelné oblasti světelného spektra, za použití deionizované vody pro nastavení absorbance blanku. Záznam jejich absorpčních spekter je uveden na Obr. 4.1.



Obrázek 4.1 Absorpční spektrum $\text{Fe}(\text{SAL})^+$ v rozmezí vlnových délek 200 – 800 nm

$c_{(\text{SALNa})} = 1 - 0$; 2 – $1,0 \times 10^{-4}$; 3 – $3,0 \times 10^{-4}$; 4 – $4,0 \times 10^{-4}$; 5 – $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} v $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} VČ a $12,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} H_2SO_4 , blank – deionizovaná voda

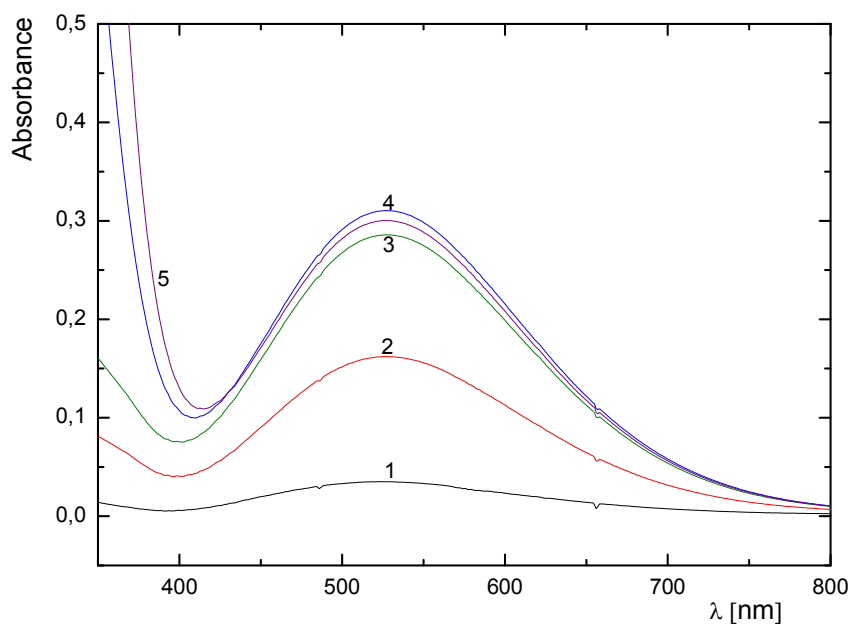
Z důvodu absorpce samotného vybarvovacího činidla v ultrafialové oblasti spektra nelze v měření využít přirozenou vlastnost kyseliny acetylsalicylové i salicylanu sodného absorbovat záření vlnové délky 294 nm. Ze zaznamenaných spekter je patrné absorpční maximum vznikajícího fialového komplexu při vlnové délce 529 nm. Tato vlnová délka byla nadále využita pro detekci komplexu v následujících měřeních.

4.1.2 Vliv koncentrace vybarvovacího činidla

Do odměrných baněk s výslednou koncentrací $2,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} SALNa byly přidány příslušné objemy $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} vybarvovacího činidla, viz Tab. 4.1, přídavek kyseliny a doplněny deionizovanou vodou. Následně proměřené roztoky v rozsahu vlnových délek 400 – 800 nm jsou zobrazeny na Obr. 4.2 jako absorpční spektra přidávaných objemů nebo na Obr. 4.3 jako závislost velikosti absorbance vzniklého komplexu na koncentraci vybarvovacího činidla v odměrné baňce. Jako blanky byly použity roztoky se stejnou koncentrací vybarvovacího činidla, ale bez obsahu SALNa.

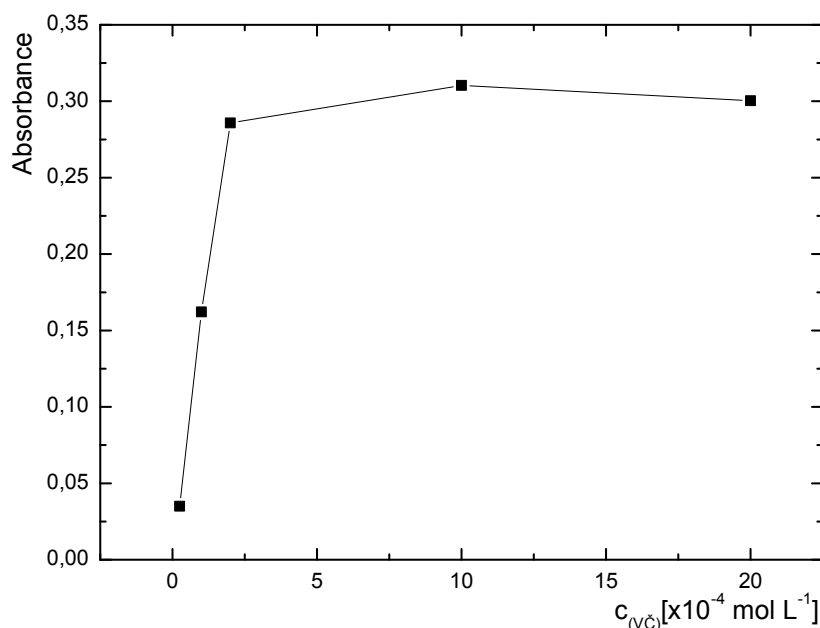
Tabulka 4.1 Objemy $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovacího činidla přidané do 25mL odměrných baněk o koncentraci $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa v $12,0 \times 10^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$.

Objem VČ [mL]	Koncentrace VČ [$\times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$]
0,1	0,2
0,5	1,0
1,0	2,0
5,0	10,0
10,0	20,0



Obrázek 4.2 Absorpční spektra $\text{Fe}(\text{SAL})^+$, 400 – 800 nm – vliv objemu $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovacího činidla

$V_{(\text{VČ})} = 1 - 0,1 \text{ mL}; 2 - 0,5 \text{ mL}; 3 - 1,0 \text{ mL}; 4 - 5,0 \text{ mL}; 5 - 10 \text{ mL}$, $c_{(\text{VČ})} = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(\text{H}_2\text{SO}_4)} = 12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(\text{SALNa})} = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $\lambda = 529 \text{ nm}$, blank – deionizovaná voda



Obrázek 4.3 Vliv koncentrace vybarvovacího činidla na spektrofotometrické stanovení $\text{Fe}(\text{SAL})^+$
 $c_{(v\check{c})} = 0,2 - 20,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(\text{H}_2\text{SO}_4)} = 12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(\text{SALNa})} = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$,
 $\lambda = 529 \text{ nm}$, blank – deionizovaná voda

Z obou grafů je patrný nárůst velikosti absorbance záření společně s obsahem (koncentrací) vybarvovacího činidla, způsobený úměrnou tvorbou chelatačního komplexu. V případě nízké koncentrace vybarvovacího činidla je pouze malá část železitých iontů vázána do komplexu s vybarvovacím činidlem, které se tím zcela spotřebuje. Maxima je dosaženo přidavkem 5,0 mL $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovacího činidla do 25mL odměrné baňky, což odpovídá výsledné koncentraci $10,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovacího činidla, zvolené pro další analýzy.

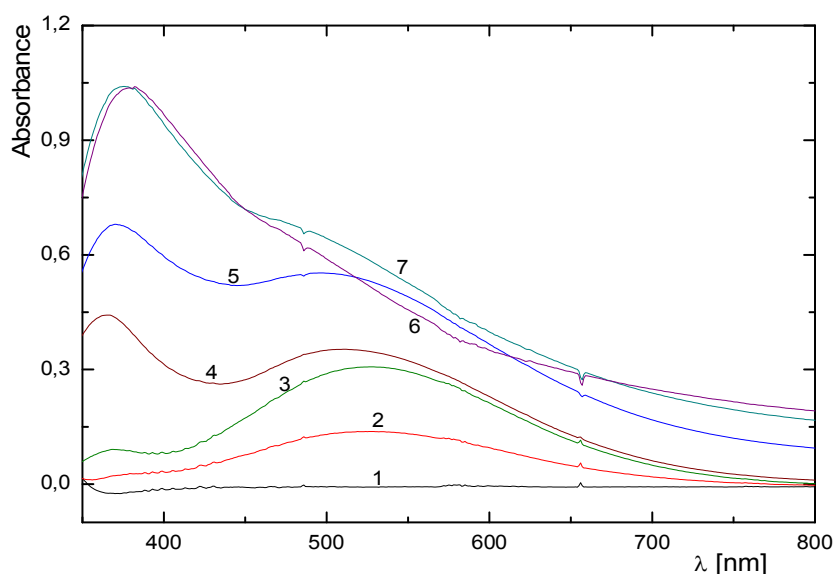
4.1.3 Vliv pH na spektrofotometrické stanovení

Vzhledem k požadavku na mírně kyselé pH prostředí ovlivňujícího vznik fialového komplexu $\text{Fe}(\text{ASA})^+$, byla tato skutečnost prověřena použitím dvou variant úpravy pH. A to pomocí B. R. pufru a změnou pH roztoky hydroxidu sodného a kyseliny sírové.

K pracovním roztokům SALNa o koncentraci $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ bylo odměřeno 5,0 mL vybarvovacího činidla BEZ přidavku kyseliny sírové. Následně byly odměrné baňky doplněny B. R. pufrům s upraveným pH na hodnoty 2; 4; 6; 8; 10. Z důvodu

absence fialového zabarvení roztoků po přidání pufru, nebyly tyto roztoky dále měřeny. Nevytvoření fialového chelatačního komplexu je zřejmě způsobeno zvolením pufru o nevhodném složení, mající za následek snížení disociace sodné soli kyseliny salicylové a nemožnosti koordinace karboxylového kyslíku salicylanového ligandu s iontem železa.

Následně byly připraveny roztoky o koncentraci $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa s přidavkem 5,0 mL vybarvovacího činidla s kyselinou, doplněné deionizovanou vodou s hodnotami pH upravenými na 3; 4; 5; 6 a 7 pomocí hydroxidu sodného (2 g rozpuštěné v 250 mL deionizované vody) a $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ kyseliny sírové. Dále byla zjištěna hodnota pH roztoku $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa s přidavkem 5,0 mL vybarvovacího činidla S obsahem a BEZ obsahu kyseliny sírové. Při měření absorpčních spekter v oblasti 400 – 800 nm, Obr. 4.4, byl zaznamenáván vliv pH roztoku na tvorbu požadovaného komplexu s absorpčním maximem v 529 nm, blank tvořilo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovací činidlo.



Obrázek 4.4 Absorpční spektra $\text{Fe}(\text{SAL})^+$, 400 – 800 nm – vliv pH

$\text{pH} = 1 - 1$; $2 - 2$; $3 - 2,45$ ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa + $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ VČ s H_2SO_4); $4 - 2,98$ ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa + $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ VČ bez H_2SO_4); $5 - 3$; $6 - 4$; $7 - 5$,
 $c_{(\text{VČ})} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(\text{SALNa})} = 2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(\text{H}_2\text{SO}_4)} = 12 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$,
blank – $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ VČ

Průběh spekter odpovídá skutečnosti uváděné v literatuře, že vysoká koncentrace H_3O^+ iontů v silně kyselém prostředí vytěsňuje železitý kationt z komplexu. Při zvyšování hodnoty pH prostředí se postupně zvyšuje míra disociace salicylanového ligandu za tvorby vyšších komplexů či směsných komplexů. Vysoce zásadité pH rozkládá chelát až na hydroxidový komplex. Pouze oblast patrná na grafu v rozmezí jednotek pH 2 – 4 poskytuje podmínky pro vznik kladně nabitého chelatačního komplexu $\text{Fe}(\text{ASA})^+$. Z tohoto důvodu byl přídavek o výsledné koncentraci $12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ kyseliny sírové, odpovídající pH 2,45, zvolen za optimální.

4.2 Uspořádání měření FIA

Cílem optimalizačního postupu spektrofotometrického stanovení acetylsalicylové kyseliny technikou FIA bylo nalezení optimálních podmínek poskytujících maximální citlivost, s co nejnížší disperzí zón, za spotřeby minimálního množství reagentů, v co nejkratším čase. Na zajištění optimálních podmínek měření se podílí rychlost průtoku nosného média, objem dávkovací a reakční smyčky, koncentrace vybarvovacího činidla a integrační čas.

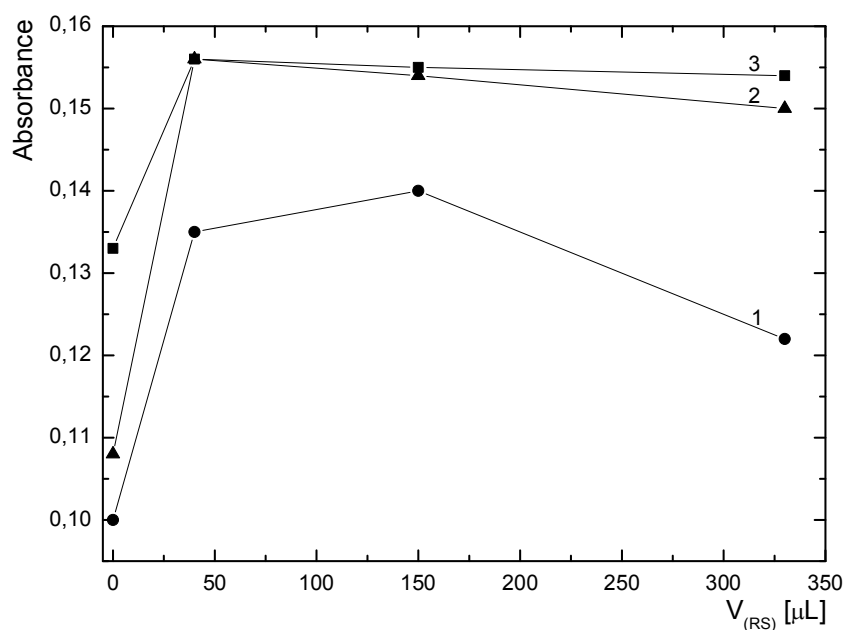
Uspořádání měření obsahu kyseliny acetylsalicylové bylo provedeno ve dvojím režimu. První možností bylo zařazení proudu roztoku vybarvovacího činidla jako nosného toku v aparatuře. Toto uspořádání bylo méně náročné na přístrojové vybavení, neboť transport všech roztoků zajišťovala pouze jedna peristaltická pumpa kontinuálně čerpající vybarvovací činidlo. Výsledky zón reakčního roztoku (SALNa, farmaka i blanku – H_2O), dávkovaného stejným způsobem popsaným v kapitole 3.6.2 (deionizovaná voda zaměněna za zásobní roztok vybarvovacího činidla, bez přívodu před reakční smyčku), poskytovaly vysoké nepravidelné píky se značnou disperzí a šumem. Proto byla pro další měření zvolena druhá možnost a to dávkování zón vzorku do proudu deionizované vody s následným zaváděním vybarvovacího činidla těsně před reakční smyčku.

Jednotlivé analýzy byly detekovány jako časový záznam aktuální hodnoty absorbance roztoku procházejícího průtokovou detekční celou. Získaná data byla vyhodnocována na základě výšky a tvaru píku ovlivňovaného změnami jednotlivých optimalizovaných parametrů. Každý parametr byl proměřen 3x, hodnoty testovány na odlehlost výsledků, následně zprůměrovány a vyneseny do grafů realizovaných v programu Origin 6.0. V tomto uspořádání nebylo nutné od absorbancí vlastních analýz odečítat hodnoty absorpce blanku, neboť základní linie byla nastavena na absorbanci nosného toku deionizované vody s vybarvovacím činidlem.

Počáteční podmínky měření nastavené na FIA aparatuře byly zvoleny, z předběžných výsledků analýz v kontinuálním průtokovém uspořádání, následovně: průtoková rychlost vybarvovacího činidla o koncentraci $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ byla $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ roztok SALNa; průtoková rychlost deionizované vody $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Pokud není uvedeno jinak, byl při všech měření nastaven integrační čas 100 ms; $\lambda = 529 \text{ nm}$ a Boxcar Width 10, základní linie nulována na nosný tok.

4.2.1 Optimalizace objemu dávkovací a reakční smyčky

První krok optimalizace zahrnoval zvolení nejvhodnějšího objemu dávkovací a reakční smyčky. V aparatuře byly z důvodu výrazného šumu základní linie současně použity kombinace smyček o objemech 100; 250; 400 μL dávkovací smyčky a 0; 40; 150; 330 μL reakční smyčky vytvořených z teflonových kapilár.



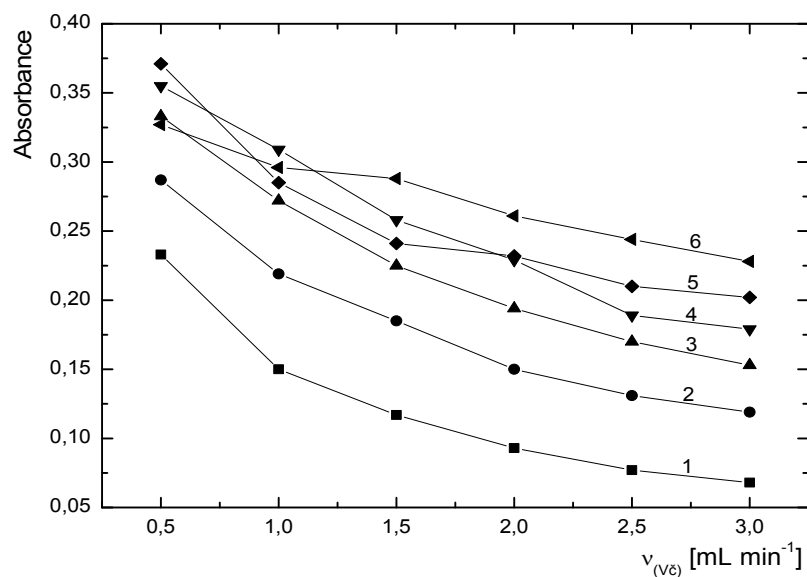
Obrázek 4.5 FIA optimalizace objemu dávkovací a reakční smyčky

$V_{(DS)} = 1 - 100 \mu\text{L}; 2 - 250 \mu\text{L}; 3 - 400 \mu\text{L}, V_{(RS)} = 0; 40; 150; 330 \mu\text{L},$
 $c_{(SALNa)} = 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}, c_{(H_2SO_4)} = 12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}, c_{(V\check{C})} = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1},$
 $v_{(V\check{C})} = 1,0 \text{ mL min}^{-1}, v_{(H_2O)} = 0,5 \text{ mL min}^{-1}, t_i = 100 \text{ ms}$

Ze závislostí vynesných v grafu na Obr. 4.5 je patrné, že nejvyšších hodnot absorbancí zaznamenaných píků dosahovaly dávkovací smyčky v kombinaci se 40 μL reakční smyčkou. Maximální výška odpovídá dávkovacím smyčkám o objemu 250 μL a 400 μL . Z důvodu zamezení nadbytečné spotřeby vzorku byla pro další měření zvolena 250 μL dávkovací smyčka v kombinaci s 40 μL reakční smyčkou.

4.2.2 Optimalizace průtokové rychlosti vody a vybarvovacího činidla

Dalšími optimalizovanými parametry byly rychlosti průtoku nosného média (deionizované vody) a následně zaváděného proudu vybarvovacího činidla. Zvolené průtokové rychlosti tvořily vzájemné kombinace hodnot v rozmezí $0,5 - 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, po kroku $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Do aparatury FIA byly začleněny výše optimalizované smyčky o objemu $250 \mu\text{L}$ dávkovací a $40 \mu\text{L}$ reakční smyčky.



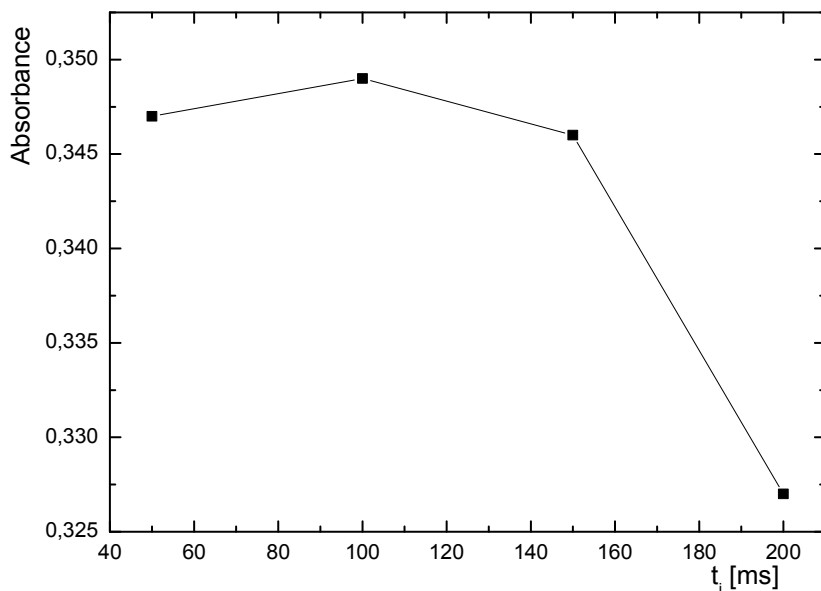
Obrázek 4.6 FIA optimalizace průtokové rychlosti vody a vybarvovacího činidla

$v_{(H_2O)} = 1 - 0,5 \text{ mL min}^{-1}$; $2 - 1,0 \text{ mL min}^{-1}$; $3 - 1,5 \text{ mL min}^{-1}$; $4 - 2,0 \text{ mL min}^{-1}$; $5 - 2,5 \text{ mL min}^{-1}$; $6 - 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(VČ)} = 0,5 - 3,0 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{(DS)} = 250 \mu\text{L}$, $V_{(RS)} = 40 \mu\text{L}$, $c_{(SALNa)} = 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(VČ)} = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(H_2SO_4)} = 12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $t_i = 100 \text{ ms}$

Sestupná tendence všech zvolených průtokových rychlostí deionizované vody v kombinacích s průtokovými rychlostmi vybarvovacího činidla, viz. Obr. 4.6, zřetelně dokazuje negativní vliv zvyšující se průtokové rychlosti nosného toku na velikost absorbance. Naopak časové náročnosti analýz s rostoucí hodnotou transportu reagentů do detekční cely klesaly. Optimální hodnota průtokové rychlosti $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ deionizované vody společně s průtokovou rychlostí vybarvovacího činidla $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ umožňovala dostatečné promíchání vybarvovacího činidla se zónou vzorku, za přijatelné disperze v nosném toku a doby analýzy.

4.2.3 Optimalizace integračního času

Pro optimalizaci souvislostí mezi integračním časem a detekovanou výškou píku chelatačního komplexu byly zvoleny hodnoty 50; 100; 150; 200 ms. Jednotlivé vyhodnocené závislosti zachycuje graf na Obr. 4.7.



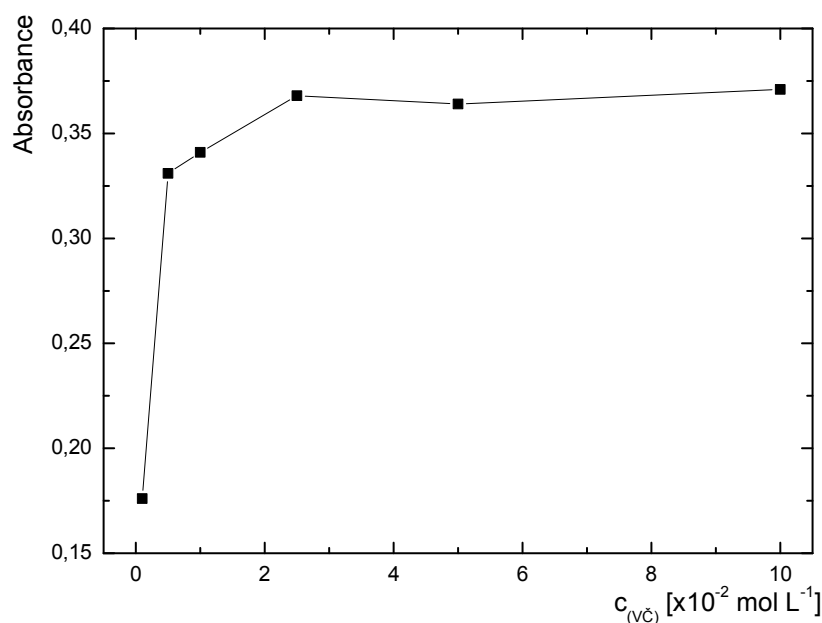
Obrázek 4.7 FIA optimalizace integračního času

$t_i = 50 - 100 \text{ ms}$, $V_{(DS)} = 250 \text{ } \mu\text{L}$, $V_{(RS)} = 40 \text{ } \mu\text{L}$, $v_{(V\check{C})} = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(H_2O)} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$,
 $c_{(SALNa)} = 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(V\check{C})} = 2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(H_2SO_4)} = 12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Zvyšující se doba měření absorbance poskytovala užší píky s hladším průběhem, ale od hodnoty 100 ms docházelo ke snižování jejich výšek. Nejcitlivější stanovení salicylanového komplexu s železitými ionty umožňoval integrační čas 100 ms, i nadále používaný pro další analýzy.

4.2.4 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

Posledním optimalizovaným parametrem byla koncentrace vybarvovacího činidla tvořená roztoky s obsahem 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; $10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a upraveným pH kyselinou sírovou. Vliv koncentrace vybarvovacího činidla na velikost absorbance tvořícího se komplexu vyjadřuje graf na Obr. 4.8.



Obrázek 4.8 FIA optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

$c_{(VČ)} = 0,1 - 10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $V_{(DS)} = 250 \text{ } \mu\text{L}$; $V_{(RS)} = 40 \text{ } \mu\text{L}$; $v_{(VČ)} = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$;
 $v_{(H_2O)} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$; $c_{(SALNa)} = 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $c_{(H_2SO_4)} = 12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $t_i = 100 \text{ ms}$

V celém sledovaném rozsahu koncentrací je viditelný nárůst intenzity měřeného signálu společně se zvyšujícím se obsahem dusičnanu železitého v použitých roztocích. Hodnoty absorbance nejstrměji vzrůstají až do koncentrace $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovacího činidla, kde dosahují maxima a dále se mění jen minimálně. Koncentrace $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovacího činidla tedy byla zvolena za optimální.

4.2.5 Optimální podmínky FIA

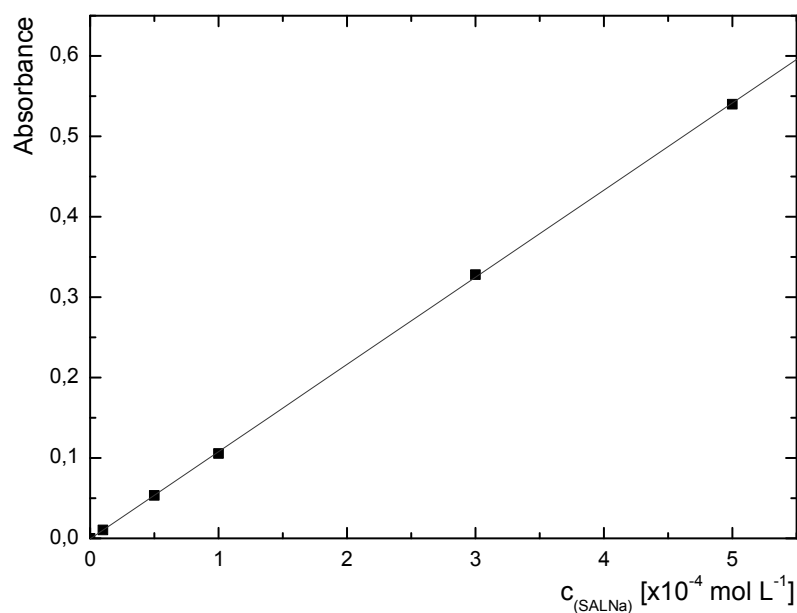
Zohledněním všech výše optimalizovaných parametrů na tvorbu salicylanového komplexu, zrekapitulovaných v následující Tab. 4.2, lze kyselinu acetylsalicylovou zvolenou metodou stanovit s nejvyšší citlivostí, při co nejmenší spotřebě reaktantů, minimálním rozmytí zón a v co nejkratším čase.

Tabulka 4.2 Schéma nastavení optimálních podmínek měření – FIA uspořádání

Parametr	Hodnota
Základní linie	nosný tok
Nosný tok	deionizovaná voda + vybarvovací činidlo
Vlnová délka	529 nm
Integrační čas	100 ms
Boxcar Width	10
Dávkovací smyčka	250 µL
Reakční smyčka	40 µL
Koncentrace VČ	$2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$
Rychlost průtoku VČ	$0,5 \text{ mL min}^{-1}$
Rychlost průtoku deionizované H ₂ O	$2,5 \text{ mL min}^{-1}$
Koncentrace H ₂ SO ₄	$12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

4.2.6 Kalibrační řada FIA

Trojnásobným proměřením a statistickým vyhodnocením kalibrační řady o koncentraci 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10; 25; $50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa za optimálních podmínek (Tab. 4.2) byla získána kalibrační závislost spektrofotometrického stanovení kyseliny acetylsalicylové pro FIA uspořádání. Statisticky vyhodnocené výšky absorpčních maxim jsou vyneseny v závislosti na koncentraci salicylanového iontu v grafu na Obr. 4.9. Na tomto grafu je uvedena lineární část kalibrační závislosti pro nízké koncentrace. Lineární závislost byla pozorována až do hodnoty $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ s hodnotou absorbance v maximu 1,105 absorbančních jednotek, pro vyšší koncentrace docházelo k zakřivení závislosti. Základní linii tvořil nosný tok deionizované vody s konstantně zaváděným roztokem $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovacího činidla.



Obrázek 4.9 FIA kalibrační řada spektrofotometrického stanovení kyseliny acetylsalicylové

$c_{(SALNa)} = 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{(DS)} = 250 \text{ } \mu\text{L}$, $V_{(RS)} = 40 \text{ } \mu\text{L}$,
 $v_{(VČ)} = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(H_2O)} = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$, $c_{(VČ)} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$,
 $c_{(H_2SO_4)} = 12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $t_i = 100 \text{ ms}$

Celý rozsah použitých koncentrací kalibrační řady poskytuje lineární kalibrační závislost spektrofotometrického stanovení kyseliny acetylsalicylové technikou FIA reakcí s železitými ionty v slabě kyselém pH. Odečtením směrnice kalibrační přímky byla určena citlivost metody $1,08 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, představující velikost odezvy signálu (velikost absorbance) vyvolanou změnou koncentrace (obsahu) analytu [47]. Korelační koeficient, charakterizující těsnost proložení přímky lineární regrese kolem experimentálních bodů, měl hodnotu 0,9999 [48]. Hodnota lineární regresní rovnice kalibrační přímky byla $y = 0,1084x - 0,0005$.

4.2.7 Charakteristiky FIA stanovení

Následně byla za nastavení optimálních podmínek (Tab. 4.2) proměřena opakovatelnost, limit detekce a limit stanovitelnosti spektrofotometrického stanovení kyseliny acetylsalicylové technikou FIA.

Vyhodnocením signálů deseti po sobě následujících analýz roztoku $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa byla získána hodnota opakovatelnosti metody ve formě relativní směrodatné odchylky $\text{RSD} = 0,71\%$.

Z důvodu absence analýz slepého vzorku, byl použit výpočet meze detekce z kontinuálně registrované nulové linie. Detekční schopnost je odvozena od koncentrace (nebo množství) analytu v dávkovaném vzorku, který v použitém detekčním systému vykazuje zvolený poměr signálu k šumu. Šumem rozumíme amplitudu výchylek základní linie a je vyhodnocena ze záznamu trvajících několik šířek píku. Vypočtená hodnota tvořená trojnásobkem poměru signál/šum $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, případně $0,540 \text{ mg L}^{-1}$, byla následně experimentálně ověřena [49]. Mez stanovitelnosti je rovna prvnímu kalibračnímu bodu kalibračního modelu a její odpovídající hodnotě x_1 . V případě, že hodnota signálu $y_s < y_1$, bude odpovídající hodnota x_s zatížena chybou, protože kalibrační funkce je platná pouze v oblasti naměřených hodnot [50]. $\text{LOQ} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, případně $1,802 \text{ mg L}^{-1}$, odpovídá trojnásobku LOD.

Časová náročnost jedné analýzy za optimálních podmínek byla tvořena 30 sekundami, s maximem výšky píku v 9 s. Objem odpadu jednoho měření je 1,5 mL roztoku.

4.2.8 Farmaceutické vzorky FIA

Optimalizované spektrofotometrické stanovení kyseliny acetylsalicylové technikou FIA bylo aplikováno na reálné farmaceutické vzorky s obsahem Acifein 250 mg, Anopyrin 400 mg a Acylpyrin 500 mg ASA. Tablety byly rozpuštěny metodou alkalické hydrolyzy, podpořené zvýšenou teplotou a obsažená kyselina acetylsalicylová byla kvantitativně převedena na sodnou sůl SALNa. Následné naředění hydrolyzátů na roztoky s přibližnou koncentrací $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa a jejich analýza za optimálních podmínek (Tab. 4.2), vedla k získání sady měření po šesti signálech. Hodnoty výšek píků byly pomocí zjištěné kalibrační závislosti přepočteny na skutečné koncentrace a obsahy ASA, podrobeny statistickému vyhodnocení a jsou uvedeny v Tab. 4.3.

Tabulka 4.3 FIA analýza reálných vzorků

Vzorek	Koncentrace [$\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$]	Koncentrace [mg L^{-1}]	Hmotnost [mg]	% obsah z tablety
Acylpyrin 500 mg ASA	3,078	555	555	110,91
Anopyrin 400 mg ASA	2,453	442	442	110,49
Acifein 250 mg ASA	1,407	253	253	101,40

U všech farmaceutických preparátů byl detekován mírně větší obsah účinné látky, než udává deklarovaná hodnota výrobcem. V porovnání s ostatními vzorky analýza Acifeinu poskytovala nejmenší odezvu, což koreluje s nejdelším časovým intervalem rozpadu tablety při hydrolyze. Přesto je dosaženo více než 100% stanovení analytu u všech roztoků, demonstrující vhodnost této metody.

4.3 Uspořádání měření SIA-LOV

Obdobně jako u spektrofotometrického stanovení kyseliny acetylsalicylové železitými ionty technikou FIA i při použití aparatury FIA Lab 3500 v SIA modu bylo nutné nejprve stanovit optimální podmínky, se záměrem získat co největší citlivost a minimalizovat rozmytí reakčních zón, spotřeby činidel a časovou náročnost analýzy.

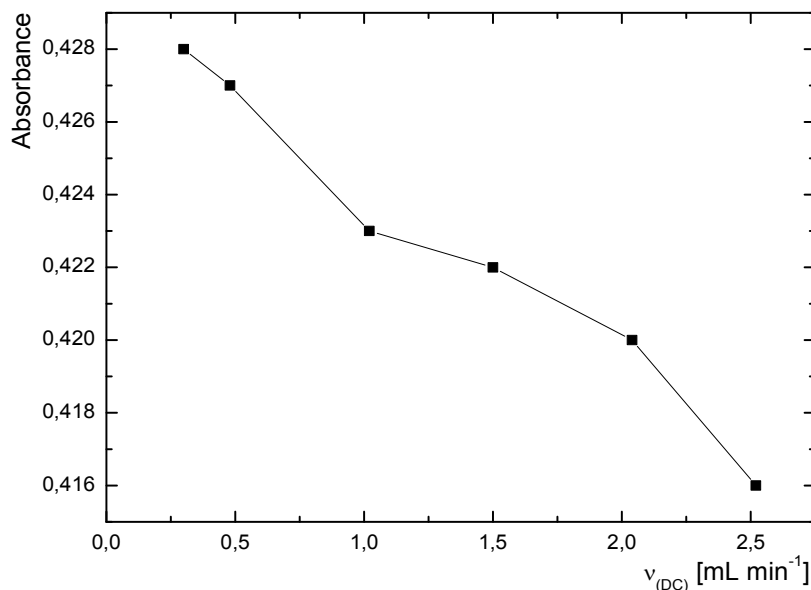
Optimalizovanými parametry ovlivňujícími míru absorbovaného záření vznikajícím chelatačním komplexem byla rychlost průtoku nosného média detekční celou, pořadí nasátých roztoků, poměr a objemy dávkovaných zón reagujících činidel, čas reagentů v reakční smyčce a koncentrace vybarvovacího činidla.

Schéma aparatury i postup měření jsou podrobně popsány v kapitole 3.7. Shodně s použitím techniky FIA se detekce jednotlivých analýz sestávala z časových záznamů hodnot absorbance úměrné aktuálnímu obsahu komplexu v roztoku protékajícího detekční celou. Data získaná ze třech opakování každého měření byla vyhodnocena dle výšky a tvaru píku a statisticky zpracována. Do grafů publikovaných níže byly vyneseny hodnoty absorbance odpovídající rozdílu slepého pokusu (nadávkován stejný objem deionizované vody jako u SALNa) a vlastní analýzy SALNa. Blank byl proměřen při každém měření optimalizovaného parametru, pro kalibrační řadu a jednotlivé farmaceutické vzorky. Základní linii tvořila hodnota naměřené absorbance deionizované vody.

Z důvodu uspořádání ovládacího programu FIALab bylo nutné zvolit všechny hodnoty průtokových rychlostí v $\mu\text{L s}^{-1}$, následně přepočtené na mL min^{-1} . Konstantě zvolené počáteční podmínky byly koncentrace SALNa $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vlnová délka absorpčních maxim 529 nm, integrační čas 50 ms, Boxcar Width 10, blank – nadávkována deionizovaná voda a základní linie – deionizovaná voda. Rychlosti dávkovaných činidel byly vlivem uvolňovaných vzduchových mikrobublinek sníženy až na průtoky $0,96 \text{ mL min}^{-1}$. Ostatní optimalizované hodnoty nastavení v programu FIALab, umožňující ovládání aparatury, tvořily: 200 μL SALNa, 200 μL vybarvovacího činidla o koncentraci $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, rychlost čerpání vody 15 mL min^{-1} , rychlost průtoku nosného toku detekční celou $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ a čas reagentů v reakční smyčce 5 s.

4.3.1 Optimalizace rychlosti průtoku detekční celou

V aparatuře SIA-LOV techniky nebylo možné převzít optimalizované průtokové rychlosti nosného toku z FIA uspořádání, neboť při hodnotě $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ docházelo v reakční smyčce k výrazné tvorbě vzduchových bublinek, což znemožňovalo jakékoliv analýzy. Sledovány byly následující průtokové rychlosti nosného média detekční celou $0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 \text{ mL min}^{-1}$, zobrazené na Obr. 4.10.



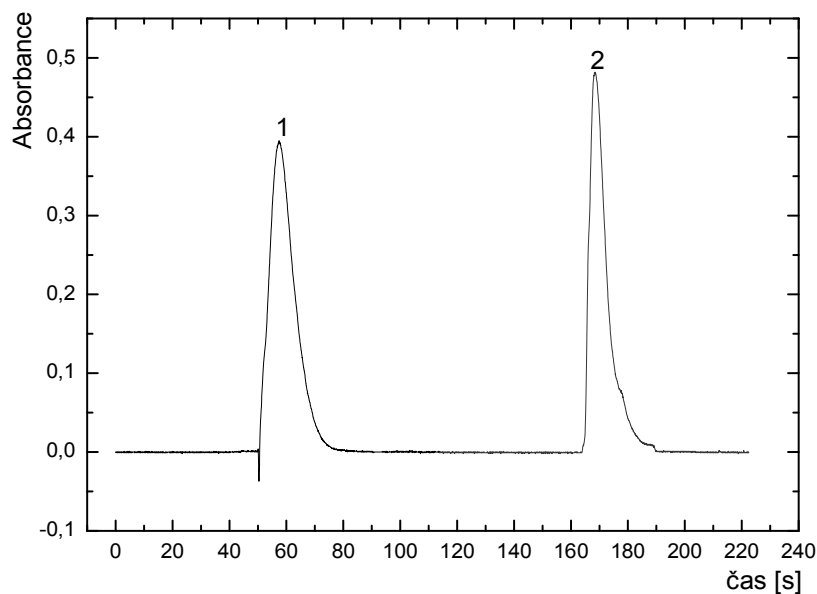
Obrázek 4.10 SIA-LOV optimalizace rychlosti průtoku detekční celou

$v_{(anal.)} = 0,3 - 2,5 \text{ mL min}^{-1}$, $c_{(SALNa)} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(V\check{C})} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$,
 $V_{(SALNa)} = 200 \text{ }\mu\text{L}$ – dávkován první, $V_{(V\check{C})} = 200 \text{ }\mu\text{L}$, $v_{(SALNa)} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$,
 $v_{(V\check{C})} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(H_2O)} = 15 \text{ mL min}^{-1}$, $t_r = 5 \text{ s}$

Záznam signálu spektrofotometrické detekce značí negativní vliv zvyšující se rychlosti průtoku na hodnoty výšek píků, dané pouze částečným promísením reaktantů. Nízké hodnoty průtoku deionizované vody naopak způsobovaly nárůst rozmytí reakčních zón a prodlužování doby analýzy. Tyto děje vedly ke zvolení průtokové rychlosti $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ detekční celou poskytující kompromis mezi dostatečným promísením a minimálním rozptylem zón v nosném toku.

4.3.2 Optimalizace pořadí čerpání roztoků

V následujícím kroku byl prověřován vliv pořadí nadávkovaných zón jednotlivých činidel v reakční smyčce. Záznam obou variant je zobrazen na Obr. 4.11. Nejprve byl čerpán roztok SALNa a následně vybarvovací činidlo, v druhé analýze bylo pořadí roztoků opačné, v obou případech za jinak stejných podmínek.



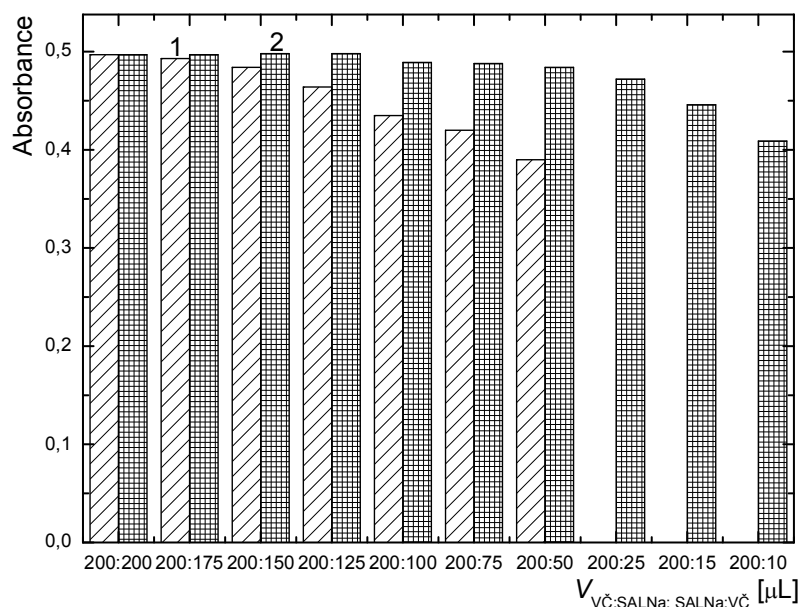
Obrázek 4.11 SIA-LOV optimalizace pořadí čerpání roztoků

1 – SALNa první, 2 – VČ první, $c_{(\text{SALNa})} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(\text{VČ})} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{(\text{SALNa})} = 200 \text{ }\mu\text{L}$, $V_{(\text{VČ})} = 200 \text{ }\mu\text{L}$, $v_{(\text{SALNa})} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(\text{VČ})} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(\text{H}_2\text{O})} = 15 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(\text{DC})} = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $t_r = 5 \text{ s}$

Z výšek píků jednotlivých analýz možného pořadí dávkovaných roztoků je zřetelné, že výhodnější je druhá možnost zahrnující nejprve nadávkování zóny vybarvovacího činidla a následně SALNa. Počáteční pokles základní linie před vzestupnou částí píku v uspořádání SALNa – vybarvovací činidlo je zřejmě dán nedostatečným promísením reakčních zón a absorpcí nezreagovaného vybarvovacího činidla s nedostatečně vymytými zbytky SALNa z předchozí analýzy. Jako náprava byl do dalších analýz zaveden konečný promývací krok tvořený 500 μL deionizované vody nasáté rychlostí 12 mL min^{-1} s následným průplachem 3 mL min^{-1} .

4.3.3 Optimalizace objemu salicylanu sodného a vybarvovacího činidla

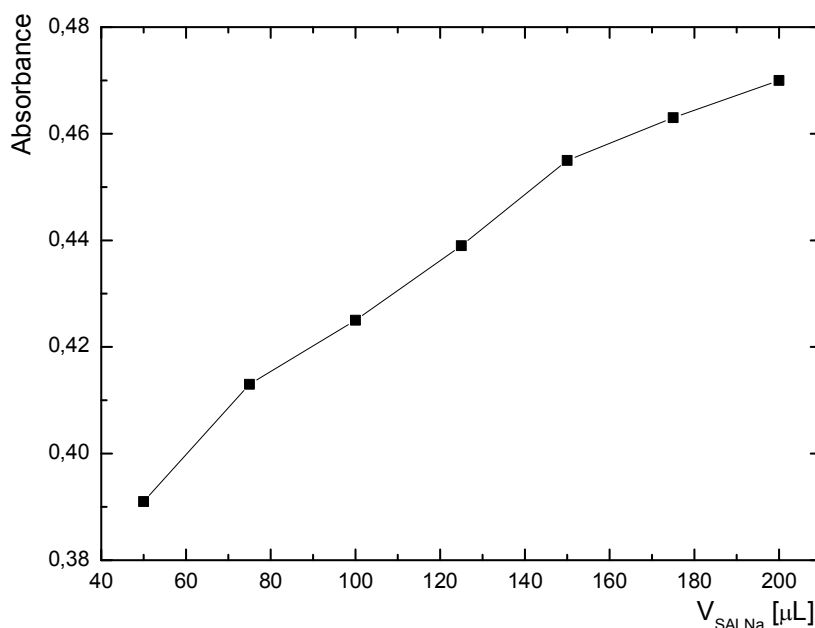
Měření dalšího optimalizovaného parametru, vzájemného poměru a velikosti dávkovaných objemů činidel, limitovala 1,0mL injekční pumpa použitá v aparatuře FIA Lab 3500. Celková suma dávkovaných objemů byla určena, s ohledem na nutnost nasátí dostatečného objemu deionizované vody, potřebného pro transport vzniklého komplexu průtokovou celou, na 400 μL . Nejprve byl zjišťován vliv dávkovaného objemu SALNa v rozsahu 50 – 200 μL , po kroku 25 μL , v kombinaci s konstantním objemem 200 μL vybarvovacího činidla. Následně byla proměřena závislost 200 μL vybarvovacího činidla s použitými objemy 10 – 200 μL SALNa. Naměřené hodnoty obou variant jsou vyneseny v grafu na Obr. 4.12.



Obrázek 4.12 SIA-LOV optimalizace objemu salicylanu sodného a vybarvovacího činidla

Poměr **1** – $V_{VČ}:SALNa$: $V_{(VČ)} = 200 \mu\text{L}$; $V_{(SALNa)} = 200; 175; 150; 125; 100; 75; 50 \mu\text{L}$,
2 – $SALNa:V_{VČ}$: $V_{(SALNa)} = 200 \mu\text{L}$; $V_{(VČ)} = 200; 175; 150; 125; 100; 75; 50; 25; 15; 10 \mu\text{L}$,
 $V_{VČ}$ – první, $v_{(DC)} = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $c_{(SALNa)} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(VČ)} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$,
 $v_{(SALNa)} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(VČ)} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(H_2O)} = 15 \text{ mL min}^{-1}$, $t_r = 5 \text{ s}$

Naměřené velikosti signálů ukazují menší změnu výšky píku projevenou v kombinaci s konstantní hodnotou SALNa, než při zachování objemu vybarvovacího činidla. Až po poměr 200 μL SALNa : 125 μL vybarvovacího činidla je absorbance téměř neměnná, proto byl objem 125 μL vybarvovacího činidla použit pro další analýzy, zahrnující změnu objemu dávkovaného SALNa (Obr. 4.13).



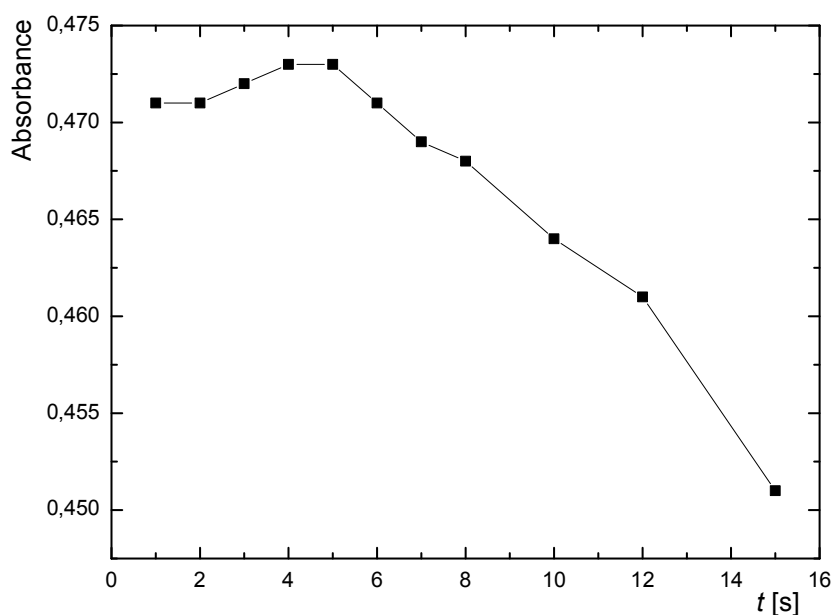
Obrázek 4.13 SIA-LOV optimalizace objemu salicylanu sodného

Objem SALNa: $V_{(\text{SALNa})} = 200; 175; 150; 125; 100; 75; 50 \mu\text{L}$,
 $V_{(\text{VČ})} = 125 \mu\text{L}$ – první, $v_{(\text{DC})} = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $c_{(\text{SALNa})} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$,
 $c_{(\text{VČ})} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $v_{(\text{SALNa})} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(\text{VČ})} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(\text{H}_2\text{O})} = 15 \text{ mL min}^{-1}$, $t_r = 5 \text{ s}$

Stejně jako na Obr. 4.12 i na Obr. 4.13 je patrné, že snižování dávkovaného objemu SALNa vede k zřetelně nižším hodnotám detekovaného signálu. Téměř lineární pokles výšek píků snižujícího se obsahu SALNa je dán vlivem úbytku tvořeného komplexu, který je i při daném objemu v nadbytku. Optimálním poměrem dosahující maximální absorbance byl zvolen objem 200 μL SALNa a 125 μL vybarvovacího činidla.

4.3.4 Optimalizace času reagentů v reakční smyčce

V tomto kroku byla optimalizována doba, po kterou dochází k vzniku chelatačního komplexu na rozhraní nadávkovaných zón v reakční smyčce, než dojde obrácením chodu pístové pumpy k jejich promísení a průchodu detekční celou. Zvolené časy setrvání reagentů v reakční smyčce tvořil interval 1 – 15 s, po kroku 1 s.



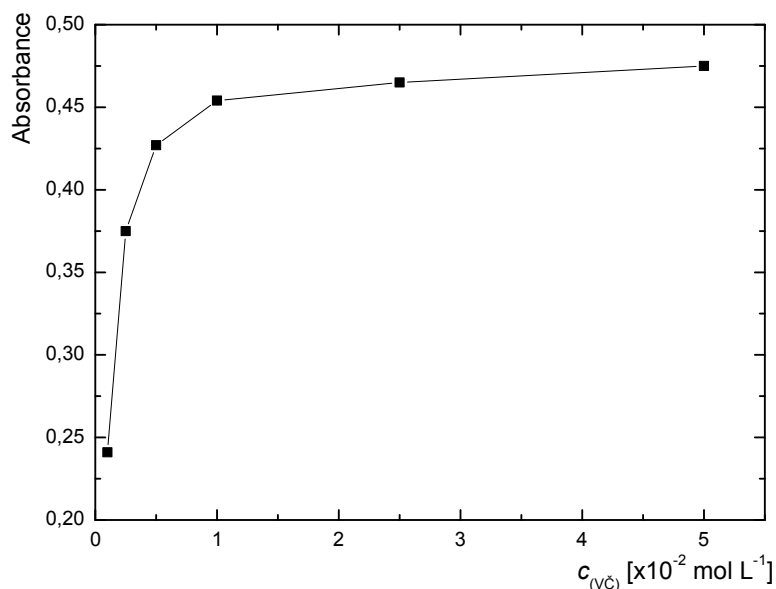
Obrázek 4.14 SIA-LOV optimalizace času reagentů v reakční smyčce

$t_r = 1 - 15$ s, $V_{(VČ)} = 125$ μL , $V_{(SALNa)} = 200$ μL , $VČ$ – první, $v_{(DC)} = 1,5$ mL min^{-1} ,
 $c_{(SALNa)} = 3 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , $c_{(VČ)} = 1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} , $v_{(SALNa)} = 0,96$ mL min^{-1} ,
 $v_{(VČ)} = 0,96$ mL min^{-1} , $v_{(H_2O)} = 15$ mL min^{-1}

Na optimalizační závislosti (Obr. 4.14) lze pozorovat průběh intenzity absorbovaného záření ovlivněného vznikem chelatačního komplexu po dobu reagentů strávenou v reakční smyčce a následném transportu k detekci v průtokové cele. Graf mající vrchol v 5 s značí čas poskytující měření za optimálních podmínek. Vyšší prodlevy bezúčelně prodlužovaly časovou náročnost analýz, s poklesem absorbance zřejmě způsobeným nárůstem disperze zóny tvořeného komplexu.

4.3.5 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

Poslední částí optimalizace pro tento způsob stanovení bylo určení hodnoty koncentrace vybarvovacího činidla ovlivňující velikost dosažených absorbancí. Ke studiu dané souvislosti byly použité roztoky obsahující 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ vybarvovacího činidla v $12,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$.



Obrázek 4.15 SIA-LOV optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

$c_{(V\check{C})} = 0,1 - 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{(V\check{C})} = 125 \text{ } \mu\text{L}$, $V_{(SALNa)} = 200 \text{ } \mu\text{L}$, $V\check{C}$ – první,
 $v_{(DC)} = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $c_{(SALNa)} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $v_{(SALNa)} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(V\check{C})} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$,
 $v_{(H_2O)} = 15 \text{ mL min}^{-1}$, $t_r = 5 \text{ s}$

Zvyšující se obsah Fe^{3+} ve vybarvovacím činidle umožňuje vzestup vzniku komplexu odpovídající nárůstu detekovaných výšek píků, znázorněných v průběhu grafu na Obr. 4.15. Vzestup signálu je patrný v celém rozsahu zvolených koncentrací, kdy nejmenší přírůstek je u nejvyšší koncentrace, z toho důvodu byl obsah vybarvovacího činidla $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ určen za optimální.

4.3.6 Optimální podmínky SIA-LOV

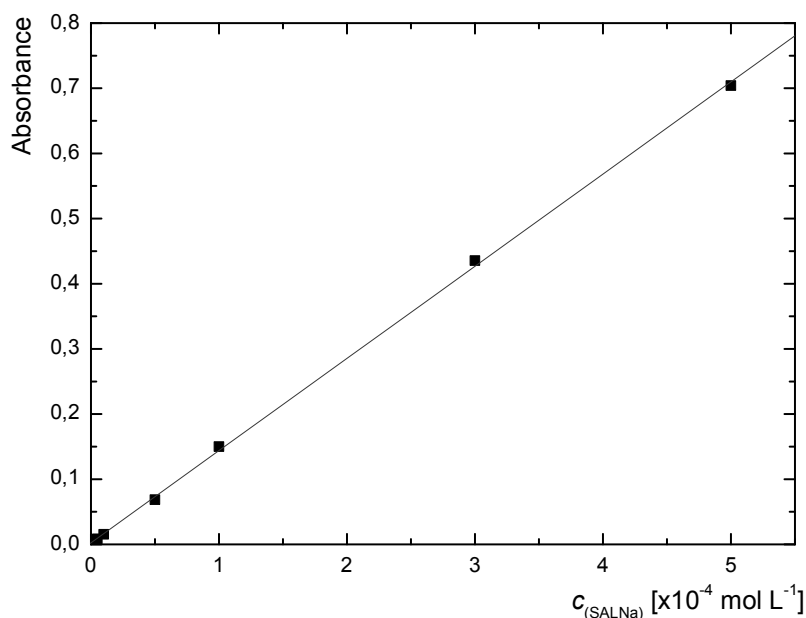
Zvolením nalezených optimálních hodnot sledovaných parametrů, souhrnně uvedených v následující Tab. 4.4, lze technikou SIA-LOV stanovit kyselinu acetylsalicylovou spektrofotometricky detekovatelnou reakcí s dosažením maximální citlivosti, minimální disperze a nejnižší náročnosti na čas a spotřebu činidel.

Tabulka 4.4 Schéma nastavení optimálních podmínek v ovládacím programu FIALab – SIA-LOV uspořádání

Průběh programu	Pozice ventilů, rychlosti aspirace, aspirované objemy	Reagent
start analýzy		
pozice vícecestného ventilu	pozice 3, reagent A	VČ
rychlost nasátí reagentu A	$16 \mu\text{L s}^{-1} \approx 0,96 \text{ mL min}^{-1}$	
nasátý objem	125 μL	
čas prodlení	5 s	
pozice přepínacího ventilu	OUT	
pozice vícecestného ventilu	pozice 6, vzorek	SALNa
rychlost nasátí vzorku	$16 \mu\text{L s}^{-1} \approx 0,96 \text{ mL min}^{-1}$	
nasátý objem	200 μL	
čas prodlení	5 s	
pozice přepínacího ventilu	IN	
rychlost nasátí nosného média	$250 \mu\text{L s}^{-1} \approx 15 \text{ mL min}^{-1}$	destil. voda
plnění pumpy nosným médiem		
pozice přepínacího ventilu	OUT	
pozice vícecestného ventilu	pozice 2, průtoková cela	
rychlost průtoku detekční celou	$25 \mu\text{L s}^{-1} \approx 1,5 \text{ mL min}^{-1}$	
vyprázdnění pumpy		
pozice přepínacího ventilu	IN	
rychlost nasátí destil. vody	$200 \mu\text{L s}^{-1} \approx 12 \text{ mL min}^{-1}$	
nasátý objem média	500 μL	
pozice přepínacího ventilu	OUT	
průtok propláchnutí	$50 \mu\text{L s}^{-1} \approx 3 \text{ mL min}^{-1}$	
vyprázdnění pumpy		
konec analýzy		

4.3.7 Kalibrační řada SIA-LOV

Kalibrační řada o koncentracích 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10; $25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa byla proměřena za nalezených optimálních podmínek (Tab. 4.4). Signál blanku, roztoku s nulovým obsahem salicylanu sodného proměřeného totožným způsobem jako roztoky kalibrační řady, byl odečten od každého třikrát proměřeného bodu kalibrační závislosti. Statisticky vyhodnocené výšky absorpčních maxim pro nízké hodnoty koncentrací kalibrační závislosti byly vyneseny v grafu (Obr. 4.16), jako závislost na obsahu salicylanového iontu pro SIA uspořádání měření. Základní linie byla nastavena na naměřenou absorbanci deionizované vody.



Obrázek 4.16 SIA-LOV kalibrační závislost spektrofotometrického stanovení acetylsalicylové kyseliny

$c_{(SALNa)} = 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{(VČ)} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{(VČ)} = 125 \mu\text{L}$,
 $V_{(SALNa)} = 200 \mu\text{L}$, $VČ$ – první, $v_{(DC)} = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(SALNa)} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$,
 $v_{(VČ)} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(H_2O)} = 15 \text{ mL min}^{-1}$, $t_r = 5 \text{ s}$,

Kalibrační závislost spektrofotometrického stanovení kyseliny acetylsalicylové technikou SIA-LOV, umožněného reakcí s železitými ionty v slabě kyselém pH, je v celém rozsahu zvolených koncentrací lineární. Citlivost metody, tvořená směrnici kalibrační přímky, mající hodnotu $1,42 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, udává velikost změny intenzity signálu vyvolanou změnou koncentrace (obsahu) analytu [47]. Korelační koeficient, charakterizující těsnost proložení přímky lineární regrese kolem experimentálních bodů, měl hodnotu 0,9996 [34]. Parametry lineární regresní rovnice $y = 0,1415 x + 0,0023$ byly následně použity pro stanovení charakteristik SIA-LOV metody.

4.3.8 Charakteristiky SIA-LOV stanovení

Zvolený analytický postup byl doplněn o získání základních charakteristik stanovení. Za optimálních podmínek (Tab. 4.4) byla zjištěna opakovatelnost, limit detekce a limit stanovitelnosti.

Opakovatelnost metody, definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti, byla stanovena na základě deseti po sobě následujících analýzách roztoku $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ SALNa a vyhodnocena formou relativní směrodatné odchylky $\text{RSD} = 0,72\%$.

Proměřením deseti stanovení roztoku o nulové koncentraci analytu (blanku) byly získány signály umožňující odhad směrodatné odchylky [51]. Mez detekce odpovídající koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu, byla vypočtena na základě definice IUPAC a rovnice kalibrační závislosti. $\text{LOD} = 0,665 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, případně $0,120 \text{ mg L}^{-1}$, je koncentrace analytu, které odpovídá signál 3σ signálu nulového vzorku. Mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle se pokládá hodnotě 0,1. $\text{LOQ} = 6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, případně $1,082 \text{ mg L}^{-1}$, vypočtený dle definice IUPAC jako koncentrace analytu ve vzorku, které odpovídá signál rovný 10σ signálu nulového vzorku.

Časová náročnost jedné analýzy za optimálních podmínek byla tvořena 110 sekundami, s maximem výšky píku v 60 s. Objem odpadu jednoho měření je 1,5 mL roztoku, ale pouze 350 μL tvoří reagenty.

4.3.9 Farmaceutické vzorky SIA-LOV

Metoda spektrofotometrického stanovení kyseliny acetylsalicylové technikou SIA-LOV, za optimálních podmínek (Tab. 4.4), byla ověřena analýzou reálných farmaceutických vzorků deklarovaného obsahu ASA, Acifein 250 mg, Anopyrin 400 mg a Acylpyrin 500 mg. Rozpuštění tablet, hydrolýza ASA, následné převedení na SALNa i ředění bylo provedeno totožným způsobem zmíněným u techniky FIA, kapitola 4.2.8. Od výšek píků získaných šestinásobným proměřením roztoků hydrolyzátů každého farmaka byl odečten signál vzorku s nulovým obsahem analytu. Rozdílové absorbance byly pomocí lineární regresní rovnice kalibrační řady přepočteny na skutečné koncentrace a obsahy ASA a podrobeny statistickému testování. Tab. 4.5 poskytuje přehledný souhrn dosažených výsledků.

Tabulka 4.5 SIA-LOV analýza reálných vzorků

Vzorek	Koncentrace [$\times 10^{-3}$ mol L ⁻¹]	Koncentrace [mg L ⁻¹]	Hmotnost [mg]	Deklarovaný obsah [%]
Acylpyrin 500 mg ASA	3,281	591	591	147,78
Anopyrin 400 mg ASA	2,584	466	466	116,40
Acifein 250 mg ASA	1,609	290	290	144,94

Stejně jako předchozí analýzy i technika SIA-LOV poskytovala detekci vyšších obsahů analytu, oproti deklarovaným hodnotám výrobcem. Lze tedy usuzovat, že byly dodrženy podmínky kvantitativní hydrolýzy tablet a převod ASA na její sodnou sůl. Míra stanovených hodnot značí úspěšné ověření účinnosti metody pro tento typ analýzy.

4.4 Porovnání metod FIA a SIA-LOV

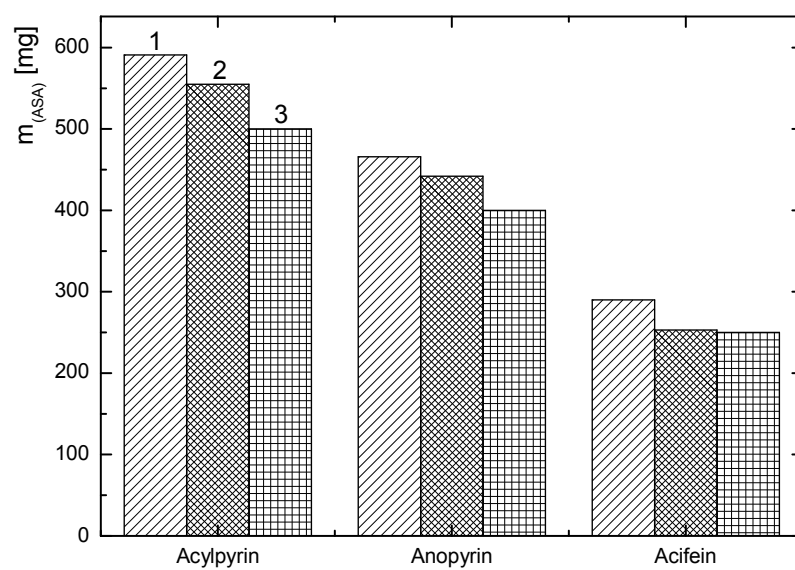
Bylo provedeno stanovení kyseliny acetylsalicylové průtokovými technikami FIA a SIA-LOV se spektrofotometrickou detekcí, zajištěnou reakcí s železitými ionty v mírně kyselém pH, za vzniku komplexu $\text{Fe}(\text{SAL})^+$. V Tab. 4.6 je uvedeno resumé naměřených základních charakteristik obou použitých technik pro spektrofotometrickou detekci ASA.

Tabulka 4.6 Porovnání charakteristik měření spektrofotometrického stanovení acetylsalicylové kyseliny technikou FIA a SIA-LOV

Parametr	Jednotka	FIA	SIA-LOV
LOD	$[\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}]$	3,0	0,67
	$[\text{mg L}^{-1}]$	0,540	0,120
LOQ	$[\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}]$	10	6,0
	$[\text{mg L}^{-1}]$	1,802	1,082
Citlivost	$[\times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ L}]$	1,08	1,42
Opakovatelnost	[%]	0,71	0,72
Korelační koeficient	–	0,9999	0,9996

Ze základních charakteristik měření je zřejmé, že stanovení kyseliny acetylsalicylové zvolenou metodou je citlivější při použití techniky SIA-LOV, zároveň je dosaženo i nižšího limitu detekce a stanovitelnosti. Hodnoty opakovatelnosti a korelační koeficienty obou technik jsou prakticky totožné.

Analýzou naředěných hydrolyzátů byla detekována absorbance vrcholu píků, následně přepočtena na koncentrace a stanovena jako obsah mg ASA v jednotlivých vzorcích. Graf na Obr. 4.17 poskytuje grafické srovnání dosažených obsahů kyseliny v jednotlivých vzorcích s deklarovanou hodnotou. Získané nadlimitní hodnoty jsou zřejmě způsobeny vyšším obsahem ASA v tabletách, než je deklarovaná hodnota, z důvodu jejího zachování po celé expirační období farmaka, což není neobvyklé.



Obrázek 4.17 Porovnání analýz reálných vzorků technikou FIA a SIA-LOV

1 – SIA-LOV; 2 – FIA; 3 – deklarovaná hodnota v 1 tabletě, $c_{(V\check{C})} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $V_{(V\check{C})} = 125 \text{ }\mu\text{L}$, $V_{(vzorku)} = 200 \text{ }\mu\text{L}$, $V\check{C}$ – první, $v_{(DC)} = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(SALNa)} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(V\check{C})} = 0,96 \text{ mL min}^{-1}$, $v_{(H_2O)} = 15 \text{ mL min}^{-1}$, $t_r = 5 \text{ s}$

5 Závěr

Byla úspěšně vypracována metoda umožňující stanovení kyseliny acetylsalicylové průtokovými metodami FIA a SIA-LOV se spektrofotometrickou detekcí. Ke stanovení byla využita vlastnost karboxylu a hydroxylu v *ortho*- poloze salicylové kyseliny vytvářet s železitými ionty chelatační komplexy. Princip detekce představoval záznam časové závislosti hodnoty absorbance, při vlnové délce maxima, odpovídající gradientu komplexu $\text{Fe}(\text{SAL})^+$ protékajícího detekční celou.

Statická měření poskytla základní přehled podmínek ovlivňujících tvorbu detekovaného komplexu. Proměření absorpčních spekter umožnilo získat vlnovou délku absorpčního maxima. Následně byla ověřena nutnost slabě kyselého pH prostředí ovlivňující disociaci kyseliny salicylové a vznik chelatačního komplexu.

Na sestavené aparatuře shodující se s principem a požadavky techniky FIA a komerčně vyrobené aparatuře SIA-LOV byly nalezeny optimální podmínky, za kterých analýzy poskytují hodnoty signálu s největší citlivostí, minimální disperzí reakčních zón, spotřeby činidel a časovou náročností analýzy. Sodná sůl kyseliny použitá jako standard umožnila aplikaci metody na reálné vzorky.

Vzájemné porovnání použitých technik lze provést ze stanovených validačních parametrů. Limit detekce FIA tvořen hodnotou $\text{LOD} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a citlivostí $1,084 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ neumožňuje citlivější stanovení s dosažením nižších obsahů analytu než technika SIA-LOV s $\text{LOD} = 0,665 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a citlivostí $1,415 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Měřením opakovatelnosti analýz byly získány téměř identické hodnoty obou technik, FIA RSD = 0,71 % a SIA-LOV RSD = 0,72 %. Těsnost shody bodů kalibračních řad vyjádřená korelačním koeficientem pro techniku FIA vyšel o něco lépe.

Míra úspěšnosti zvolených optimálních podmínek byla otestována analýzou třech reálných vzorků farmaceutických tablet obsahující kyselinu acetylsalicylovou. Vzorky tvořily tablety Acifeinu s deklarovaným obsahem 250 mg ASA, Anopyrinu s deklarovaným obsahem 400 mg a Acylpyrinu s deklarovaným obsahem 500 mg ASA. Detekcí obsahu v jednotlivých vzorků převyšující 100 % lze prokázat vhodnost optimálních podmínek i úpravu vzorků. Míra stanovených hodnot v reálných vzorcích značí úspěšné ověření účinnosti nalezených podmínek metod pro tento typ analýzy.

Soupis bibliografických citací

1. Paseková H., Polášek M., Solich P., Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy*, **93**, 354-359 (1999).
2. van Linden W. E.: Classification and definition of analytical methods based on flowing media. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, **12**, 2493-2500 (1994).
3. Ruzicka J., Hansen E.H.: Retro-review of flow-injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **27**:5 (2008).
4. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha, Karolinum 2005.
5. Růžička J., *Flow Injection Analysis, 4th Edition*. [Disk DVD], 2009.
6. GlobalFIA: *Tutorials Lesson 2 - Sequential Injection Analysis*. Dostupné z URL: <http://www.globalfia.com/> [cit. 18.4.2013].
7. Parikh A., Patel K., Patel Ch.: Flow injection: A new approach in analysis. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2**:2, 118-125 (2010).
8. Karlíček R., Solich P.: Trendy v rozvoji a aplikaci průtokové injekční analýzy v analýze léčiv. *Československá farmakologie*, **2**, 62-68 (1992).
9. Sakai T., Teshima N.: Advancement of Flow-based Analysis with Alternative Chemical Reactions and New Devices for Environmental and Biological Samples. *The Japan Society for Analytical Chemistry, Analytical Sciences*, **24**, 855-864 (2008).
10. prof. Calatayud J. M.: *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals, Automation in the laboratory*. London, Taylor & Francis Ltd 1996.
11. Hartwell K. S.: Flow Injection/Sequential Injection Analysis Systems: Potential Use as Tools for Rapid Liver Diseases Biomarker Study. *International Journal of Hepatology*, **8** (2012).
12. Mervartová K., Polášek M., Calatayud J. M.: Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **45**, 367-381 (2007).

13. Yenicali D., Dogrukol-Ak D., Tuncel M.: Determination of lansoprazole in pharmaceutical capsules by flow injection analysis using UV-detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **36**, 145-148 (2004).
14. GlobalFIA: *Tutorials Lesson 7 - Sequential Injection Analysis*. Dostupné z URL: <<http://www.globalfia.com/>> [cit. 26.4.20013].
15. Solich P., Sklenářová H., Polášek M., Karlíček R.: Application of flow injection techniques in pharmaceutical analysis. Part I: Spectrophotometric and chemiluminescence detection. *J. Flow Injection Anal.*, **18**:2, 118-125 (2001).
16. Pimenta, A.M., Montenegro M. C. B. S. M., Araújo A. N., Calatayud J. M.: Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **40**:1, 16-34 (2006).
17. Klimundová, J., Sklenářová H., Schaefer U. F., Solich P.: Automated system for release studies of salicylic acid based on a SIA method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **37**:5, 893-898 (2005).
18. Tzanavaras P. D.: Sequential Injection Analysis: A useful Analytical Tool in Drug Dissolution Testing. *Pharmaceutica Analytica Acta*, **3**:5, 114-115 (2012).
19. Mesquita R. B. R., Rangel A. O. S. S.: A review on sequential injection methods for water analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1**:648, 7-22 (2009).
20. Pérez-Olmos, R., Soto J. C., Zárate N., Araújo A. N.: Application of sequential injection analysis (SIA) to food analysis. *Food Chemistry*, **90**:3, 471-490 (2005).
21. Fletcher, P. J., van Staden J. F.: Determination of ethanol in distilled liquors using sequential injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta*, **499**:1-2, 123-128 (2003).
22. Economou A.: Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *Trends in Analytical Chemistry*, **5**:24, 416-425 (2005).
23. Bell K. Y.: Emerging Pollutants. *Water Environment Research*, **83**:10, 1906-1984 (2011).
24. Wang J., Harald E.H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **22**:4, 225-230 (2003).

25. Chen, X. W., Wang J. H.: The miniaturization of bioanalytical assays and sample pretreatments by exploiting meso-fluidic lab-on-valve configurations: A review. *Analytica Chimica Acta*,. **602**:2, 173-180 (2007).
26. Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2004.
27. Klouda P.: *Moderní analytické metody*. 2. Ostrava, Nakladatelství Pavel Klouda 2003.
28. Melichar B.a.kol.: *Chemická léčiva*. Praha, Avicenum 1987.
29. Ministerstvo zdravotnictví České Republiky: *Český lékopis 2002 2. díl*. Praha, Grada Publishing a. s. 2002.
30. Arnoštová L.: *Organika I. Praktické cvičení z lékařské biochemie, Některé reakce z organické chemie*. Praha, Ústav lékařské biochemie 1.LF UK, 2009.
31. Lincová D., Farghali H., et. al.: *Základní aplikovaná farmakologie*. 2. Praha, Nakladatelství Galén, 2007.
32. Syxtus H.: *Speciální farmakologie Díl IV. Látky ovlivňující kardiovaskulární systém*. Praha, Karolinum, 1997.
33. Syxtus H.: *Speciální farmakologie Díl II. Autakoidy a látky ovlivňující bolest*, Praha, Farmakologický ústav 1.LF univerzity Karlovy, 1995.
34. Bartušek M., Pazourek J.: *Základy metod analytické chemie pro bakalářské studijní programy*. Dostupné z URL: http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek_skripta.pdf [cit. 10.6.2013].
35. Athawale V. D., Mathur P.: Complexation of Iron(III) by Salicylic Acid. Dostupné z URL: <http://www.d.umn.edu/~psiders/courses/chem4643/labinstructions/FeSA.pdf> [cit. 1.6.2013].
36. Gil M. J., Martínez-Merino V: Determination of the free salicylic acid concentration in aspirina by forming Fe⁺³ complexes. Pamplona, Universidad Pública de Navarra 2007. Dostupné z URL: http://www.iupac.org/fileadmin/user_upload/publications/cd/Medicinal-Chemistry/Practica-I-11.pdf [cit. 1.8.2013].

37. Pereira A. V., Aniceto C., Fatibello-Filho O.: Flow injection spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid in tablets after on-line microwave-assisted alkaline hydrolysis, *The Analyst*, **123**, 1011-1015 (1998).
38. Lorent-Martínez, E. J., et al.: Fast determination of salicylic acid in pharmaceuticals by using a terbium-sensitized luminescent SIA optosensor. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**:2, 791-797 (2008).
39. Mitić S. S., Miletić G. Ž., et al.: Quantitative Analysis of Acetylsalicylic Acid in Commercial Pharmaceutical Formulations and Human Control Serum Using Kinetic Spectrophotometry. *Acta Chimica Slovenica*, **55**:3, 508-515 (2008).
40. Pasekova H., Sales M. G., Montenegro M. C., Arau A. N., Polášek M.: Potentiometric determination of acetylsalicylic acid by sequential injection analysis (SIA) using a tubular salicylate-selective electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **24**, 1027-1036 (2001).
41. Rover Jr. L., Garcia C. A. B., Neto G. O., Kubota L. T., Galembeck F.: Acetylsalicylic acid determination in pharmaceutical samples by FIA-potentiometry using a salicylate-sensitive tubular electrode with an ethylene-vinyl acetate membrane. *Analytica Chimica Acta*, **366**, 103-109 (1998).
42. Kubota L. T., Fernandes J. C. B., Rover Jr. L., Neto G. O.: Determination of acetylsalicylic acid by FIA-potentiometric system in drugs after on-line hydrolysis. *Talanta*, **50**, 661-667 (1999).
43. Catarino R. I., Gascia M. B., Lapa R. A., Lima J. L., Barrado E.: Sequential determination of salicylic and acetylsalicylic acids by amperometric multisite detection flow injection analysis. *Journal of AOAC International*, **85**:6 (2002).
44. Ruiz-Medina A., Cordova F. M. L., Ortega-Barrales P., Molina-Díaz A.: Flow-through UV spectrophotometric sensor for determination of (acetyl)salicylic acid in pharmaceutical preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, **216**, 95-104 (2001).
45. Parham, H., Rahbar N.: Solid phase extraction–spectrophotometric determination of salicylic acid using magnetic iron oxide nanoparticles as extractor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **50**:1, 58-63

- (2009).
46. Káš J., Kodíček M., Valentová O.: *Laboratorní techniky biochemie*, Praha, Vysoká škola chemicko technologická v Praze 2006.
 47. Pavlík J.: *Aplikovaná statistika*. Praha, VŠCHT 2005.
 48. Kocourek V.: Výklad pojmů v managementu kvality v analytických laboratořích. Praha, VŠCHT. Dostupné z URL: http://web.vscht.cz/~kocourev/files/SlovQA_03.pdf [18.3.2012].
 49. Plzák Z., Milde D.: *Detekční schopnost analytické metody, mez detekce, mez stanovitelnosti. Metodický list 7*, Eurachem - ČR. Dostupné z URL: <http://www.eurachem.cz/user-files/files/metodicky-list-7-final.pdf> [cit. 6.10.2011].
 50. Doerffel K.: *Optimální postup chemické analýzy*. Praha SNTL 1985.
 51. Eckschlager K.: *Chemometrie I*. Praha, Reprodukční a knihařské pracoviště PřF UK 1994.